

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005247

International filing date: 23 March 2005 (23.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-093266  
Filing date: 26 March 2004 (26.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 6 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 3 2 6 6

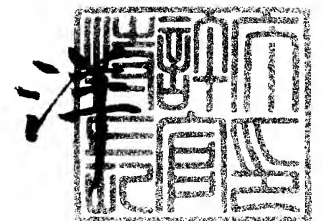
パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
J P 2 0 0 4 - 0 9 3 2 6 6  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

出 願 人  
Applicant(s): 久光製薬株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	1063
【提出日】	平成16年 3月26日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	A61P 25/00 A61P 35/00
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県千葉市中央区仁戸名町6 6 6－2 千葉県がんセンター内
【氏名】	中川原 章
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県千葉市中央区仁戸名町6 6 6－2 千葉県がんセンター内
【氏名】	尾崎 俊文
【特許出願人】	
【識別番号】	000160522
【氏名又は名称】	久光製薬株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100088155
【弁理士】	
【氏名又は名称】	長谷川 芳樹
【選任した代理人】	
【識別番号】	100128381
【弁理士】	
【氏名又は名称】	清水 義憲
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	014708
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 2】

被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p 7 3 及び I K K- $\alpha$  を発現した細胞を培養する培養工程と、  
培養したそれぞれの細胞における、p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用を測定する測定工程と、  
被検化合物の存在下において培養した細胞における p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用が、  
被検化合物の非存在下において培養した細胞における p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用よりも強い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程と、  
を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 3】

p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用を阻害する化合物を、アポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 4】

被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p 7 3 及び I K K- $\alpha$  を発現した細胞を培養する培養工程と、  
培養したそれぞれの細胞における、p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用を測定する測定工程と、  
被検化合物の存在下において培養した細胞における p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用が、  
被検化合物の非存在下において培養した細胞における p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用よりも弱い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程と、  
を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 5】

配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス促進剤。

【請求項 6】

配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス促進剤。

【請求項 7】

配列番号 2 5 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤。

【請求項 8】

配列番号 2 5 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス抑制剤。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシスを促進又は抑制する化合物をスクリーニングする方法、アポトーシス促進剤及びアポトーシス抑制剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、アポトーシスを促進又は抑制する化合物をスクリーニングする方法、アポトーシス促進剤及びアポトーシス抑制剤に関する。

【背景技術】

【0002】

アポトーシス促進性のp53やそのホモログであるp73とは対照的に、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路は、DNA損傷のような様々なアポトーシス促進性の刺激に対する細胞保護において重要な役割を演じている。通常の条件下では、NF- $\kappa$ Bはp50サブユニット及びp65 (RelA) サブユニットから構成されるヘテロダイマー複合体として存在しており、I $\kappa$ B- $\alpha$ やI $\kappa$ B- $\beta$ などの抑制性タンパク質との相互作用により、転写的に不活性の状態にある。I $\kappa$ BはNF- $\kappa$ Bの核移行シグナルをマスクしており、それによりNF- $\kappa$ Bの核移行を妨げている。

【0003】

ある刺激があると、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路の上流のレギュレーターであるI $\kappa$ Bキナーゼ (IKK) 複合体は、I $\kappa$ BのN末端のシグナル応答ドメインにある特定のセリン残基を急速にリン酸化し、I $\kappa$ Bはプロテアソーム依存的にポリユビキチン化されて分解される。その結果、I $\kappa$ BにマスクされていたNF- $\kappa$ Bの核移行シグナルが露出され、NF- $\kappa$ Bは核に移行し活性化される。IKK複合体は、2つの触媒サブユニットであるIKK- $\alpha$  (IKK-1とも呼ばれる) 及びIKK- $\beta$  (IKK-2とも呼ばれる)、並びに足場機能を有する1つの調節サブユニットであるIKK- $\gamma$  (NEMOとも呼ばれる) から構成される。

【0004】

NF- $\kappa$ Bとp53又はp73との関係については、以下のようなことが知られている。一次抗原刺激に応答して、NF- $\kappa$ Bは、T細胞におけるアポトーシス促進性のp73のアップレギュレーションを制限し、T細胞の生存を促進するが、NF- $\kappa$ Bの活性化がp73の発現を阻害している正確な分子の基盤は分かっていない (非特許文献1)。抗癌剤であるドキソルビシンに応答して、IKK- $\alpha$ ではなくIKK- $\beta$ がNF- $\kappa$ Bを活性化し、それによって、タンパク質レベルのp53の蓄積が阻害される (非特許文献2)。これらの結果は、NF- $\kappa$ Bの活性化はp53、p73又はその双方により仲介されるアポトーシスを抑制するかもしれないということを示唆している。また、これと一致して、p53とNF- $\kappa$ Bとの間に双方向性の抑制が存在することが示されている (非特許文献3)。

【0005】

対照的に、NF- $\kappa$ Bはp53の補因子として働き、p53依存性のアポトーシスに必要であるということが報告されている (非特許文献4)。さらに、p53はNF- $\kappa$ Bの直接の転写標的であることや、p53活性化シグナルはNF- $\kappa$ Bの活性化の阻害により部分的にブロックされることが示されている (非特許文献5～7)。

【0006】

【非特許文献1】 Wan, Y. Y. et al., The survival of antigen-stimulated T cells requires NF $\kappa$ B-mediated inhibition of p73 expression. *Immunity* 18: 331-342 (2003).

【非特許文献2】 Tergaonkar, V. et al., p53 stabilization is decreased upon NF $\kappa$ B activation: a role for NF $\kappa$ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 1: 493-503 (2002).

【非特許文献3】 Webster, G. A. et al, Transcriptional crosstalk between NF- $\kappa$ B and p53. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3485-3495 (1999).

【非特許文献4】 Ryan, K. M. et al., Role of NF- $\kappa$ B in p53-mediated programmed cell death. Nature 404: 892-897 (2000).

【非特許文献5】 Wu, H. et al, NF- $\kappa$ B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. J. Biol. Chem. 269: 20067-20074 (1994).

【非特許文献6】 Sun, X. et al., Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. Mol. Cell. Biol. 15: 4489-4496 (1995).

【非特許文献7】 Hellin, A. C. et al., Nuclear factor- $\kappa$ B-dependent regulation of p53 gene expression induced by daunomycin genotoxic drug. Oncogene 16: 1187-1195 (1998).

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0007】

しかしながら、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路と、p53、p73又はその双方によって仲介されるアポトーシスとの間のあり得る関係の機能的な重要性については、いまだに確立されていない。p73のアポトーシス誘導活性をそのメカニズムを含めて明らかにし、それを増強又は抑制する化合物を見出すことは、癌又は神経変性疾患の治療・予防薬の開発につながる。

##### 【0008】

したがって、本発明は、p73の活性化の分子メカニズムを解明することを目的の一つとした。そして、そのメカニズムから導き出されたアポトーシスを促進又は抑制する化合物のスクリーニング方法を提供することも目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0009】

本発明者らは、シスプラチン処理により、p73及びp53の誘導と関連してIKK- $\alpha$ が核内で顕著に蓄積することを見出した。また、IKK- $\alpha$ を発現させると、ユビキチン化を阻害することによりp73の半減期は上昇し、それによって、トランス活性化及びアポトーシス促進活性が増強することを見出した。さらに、免疫沈降及び免疫染色の実験から、p73はIKK- $\alpha$ と直接会合しており、核マトリックスにおいて両者は共存していることを見出した。以上の知見等から、本発明者らは、IKK- $\alpha$ はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進するという分子メカニズムを明らかにし、本発明を完成するに至った。

##### 【0010】

すなわち、本発明は、p73とIKK- $\alpha$ との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法は、p73とIKK- $\alpha$ とが直接相互作用するという分子メカニズムを応用したものである。かかる分子メカニズムは本発明者らが新たに見出したものであり、したがって、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物を本スクリーニング方法により得ることが可能である。かかる化合物は、アポトーシス促進剤や抗癌剤として応用することが可能である。

##### 【0011】

本発明は、また、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- $\alpha$ を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞におけるp73とIKK- $\alpha$ との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- $\alpha$ との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- $\alpha$ との相互作用よりも強い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程と、を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法により、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物を得ることが可能であり、また、

かかる化合物は、アポトーシス促進剤や抗癌剤として応用することが可能である。

#### 【0012】

本発明は、また、p73とIKK- $\alpha$ との相互作用を阻害する化合物を、アポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法は、p73とIKK- $\alpha$ とが直接相互作用するという分子メカニズムを応用したものである。かかる分子メカニズムは本発明者らが新たに見出したものであり、したがって、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物を本スクリーニング方法により得ることが可能である。かかる化合物は、アポトーシス抑制剤や神経変性疾患の治療薬として応用することが可能である。

#### 【0013】

本発明は、また、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- $\alpha$ を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- $\alpha$ との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- $\alpha$ との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- $\alpha$ との相互作用よりも弱い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程と、を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法により、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物を得ることが可能である。かかる化合物は、アポトーシス抑制剤や神経変性疾患の治療薬として応用することが可能である。

#### 【0014】

本発明は、また、配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス促進剤及び配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス促進剤を提供する。配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、IKK- $\alpha$ タンパク質である。上述したように、本発明者らは、IKK- $\alpha$ はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進するという分子メカニズムを明らかにした。このような分子メカニズムは、抗アポトーシス性の経路であるNF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路におけるIKK- $\alpha$ の役割からは、全く予想に反する。すなわち、p73が仲介するアポトーシスにおいて、IKK- $\alpha$ は、抗アポトーシス的な役割ではなく、アポトーシス促進的な役割を演じていることになる。したがって、IKK- $\alpha$ タンパク質やタンパク質をコードする核酸は、アポトーシス促進剤として用いることが可能である。

#### 【0015】

本発明は、また、配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤及び配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス抑制剤を提供する。配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、IKK- $\alpha$ の44番目のリジン残基がアラニン残基に置換されたIKK- $\alpha$  (K44A)タンパク質である。本発明者らは、IKK- $\alpha$  (K44A)はp73と結合するもののp73を安定化せず、p73が誘導するアポトーシスを抑制することを明らかにした。すなわち、p73が仲介するアポトーシスにおいて、IKK- $\alpha$  (K44A)は、抗アポトーシス的に機能し、したがって、IKK- $\alpha$  (K44A)タンパク質やタンパク質をコードする核酸は、アポトーシス抑制剤として用いることが可能である。

#### 【発明の効果】

#### 【0016】

本発明のスクリーニング方法によれば、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物及び抗アポトーシス性化合物を得ることが可能である。このような化合物を見出すことで、癌又は神経変性疾患の治療・予防に有効な薬を開発することが可能となる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0017】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

#### 【0018】

(アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法)

本発明のアポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法は、p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える。本スクリーニング方法は p 7 3 と I K K- $\alpha$  とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物が得られる。

#### 【0019】

具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、酵母ツーハイブリッド法や P C A 法（プロテイン・フラグメント・コンプリメンテーション・アッセイ）が挙げられる。酵母ツーハイブリッド法及び P C A 法の概要を以下に説明する。

#### 【0020】

まず、酵母ツーハイブリッド法を説明する。酵母 G a l 4 は、N 末端側の D N A 結合ドメイン（D B D）と C 末端側の転写活性化ドメイン（A D）とからなる転写制御因子である。両ドメインは基本的には自律的に機能し、D B D は単独で D N A に結合できるが転写の活性化は起こせない。A D はその反対である。この性質を応用して開発されたのが酵母ツーハイブリッド法である。つまり、G a l 4 の D B D に目的のタンパク質 P を融合したタンパク質（ベイト）と、G a l 4 の A D に別のタンパク質 Q を融合したタンパク質（プレイ）を酵母細胞に導入した場合、P と Q とが核内で相互作用すれば、酵母細胞内で転写制御複合体が再構成され、G a l 4 結合部位依存的に転写が活性化されることになる。この活性をレポーター遺伝子を用いて検出することにより、タンパク質 P 及び Q の間の相互作用が容易に評価できる。レポーター遺伝子としては、例えば、H I S 3、l a c Z、U R A 3 などを利用することができる。また、酵母 G a l 4 以外にも、S R F や L e x A を用いた系も利用することが可能である。

#### 【0021】

酵母ツーハイブリッド法において、タンパク質 P として p 7 3 を、タンパク質 Q として I K K- $\alpha$  を用いた系（又はその逆の系でも構わない）によれば、本発明のスクリーニング方法を行うことが可能である。すなわち、ベイトとして p 7 3 又は I K K- $\alpha$  の一方を、プレイとして p 7 3 又は I K K- $\alpha$  の他方を酵母に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該酵母を培養し、培養した酵母のレポーター遺伝子の転写活性（p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用の強さを表す）を測定し、被検化合物存在下の転写活性が被検化合物非存在下の転写活性よりも上昇している場合、被検化合物はアポトーシスを促進する化合物であると判定できる。

#### 【0022】

次に、P C A 法について説明する。P C A 法では、一つの機能タンパク質 A（酵素、転写因子など）を二つの断片 A 1 及び A 2 に分割し、それぞれを目的タンパク質 P 及び Q と融合し、融合タンパク質 A 1-P 及び A 2-Q を作製する。目的タンパク質 P 及び Q が結合すると、機能タンパク質 A の機能が回復し、その活性を検出することで、P 及び Q の相互作用を判定する、という原理に基づいている。機能タンパク質としては、例えば  $\beta$ -ラクタマーゼを利用することができる。以下では、 $\beta$ -ラクタマーゼを利用した P C A 法について説明する。

#### 【0023】

$\beta$ -ラクタマーゼは細菌由来の  $\beta$ -ラクタム環切断酵素である。N 末端側の  $\alpha$  1 9 7 断片（2 5 ～ 1 9 7 残基）と C 末端側の  $\omega$  1 9 8 断片（1 9 8 ～ 2 8 8 残基）に分割し、それぞれを目的タンパク質との融合タンパク質として発現すると、その両者が結合する場合にのみ  $\beta$ -ラクタマーゼタンパク質の立体構造が回復し、活性を示す。 $\beta$ -ラクタマーゼ活性は細胞透過性の蛍光プローブ C C F 2 / A M（C C F 2 アセトキシメチルエステル）により検出される。C C F 2 / A M は、セファロスポリン分子の両末端に 2 種類の異なる蛍光物質クマリン及びフルオレセインが結合した構造をしており、前者をドナー、後者を

アクセプターとする分子内FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）を呈する。すなわち、クマリンを409nmの光で励起すると、フルオレセイン由来の520nmの蛍光を発することになる。しかし、CCF2が $\beta$ -ラクタマーゼ活性による分解を受けると、両者が解離し、FRETは観察されなくなるため、409nmの光の励起によってクマリン本来の447nmの蛍光を発するようになる。447nmの蛍光を測定することにより、 $\beta$ -ラクタマーゼの活性、すなわち、目的タンパク質の相互作用の強さを測定することが可能となる。

#### 【0024】

したがって、PCA法を利用して本発明のスクリーニング方法を行うには、以下の方法によればよい。機能タンパク質の二つの断片A1又はA2にp73又はIKK- $\alpha$ を融合させた融合タンパク質を細胞に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該細胞を培養し、培養した細胞における機能タンパク質の活性を測定し、被検化合物存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性が、被検化合物非存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性よりも上昇している場合、被検化合物はアポトーシスを促進する化合物であると判定できる。

#### 【0025】

また、本発明のアポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法は、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- $\alpha$ を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- $\alpha$ との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- $\alpha$ との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- $\alpha$ との相互作用よりも強い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程と、を備える。本スクリーニング方法はp73とIKK- $\alpha$ とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物が得られる。

#### 【0026】

具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、免疫沈降法が挙げられる。免疫沈降法を用いたスクリーニング方法を以下に説明する。

#### 【0027】

まず、p73及びIKK- $\alpha$ を発現した細胞を調製する。p73及びIKK- $\alpha$ を発現した細胞としては、両者を発現している細胞、どちらか一方を発現している細胞に他方をトランスフェクションさせて両者を発現させた細胞、又は、いずれも発現していない細胞に両者をコトランスフェクションさせた細胞のいずれを用いてもよい。また、シスプラチン処理等の薬剤処理などにより、p73を発現させた細胞を用いてもよい。そして、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で前記細胞を培養する。培養時間は、p73とIKK- $\alpha$ とが相互作用する時間であればよく、用いる細胞の種類によって異なるが、例えば、p73及びIKK- $\alpha$ をコトランスフェクトした場合、12～48時間程度である。

#### 【0028】

次に、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- $\alpha$ との相互作用を測定する。相互作用の測定には、まず、培養した細胞を粉砕して細胞可溶化物を調製する。細胞可溶化物は細胞全体の細胞可溶化物を用いてもよいが、p73とIKK- $\alpha$ とは核内で相互作用することから、核画分の細胞可溶化物を用いることが好ましい。調製した細胞可溶化物にp73又はIKK- $\alpha$ のいずれか一方の分子に対する抗体を加えて免疫沈降を行う。そして、得られた沈殿物（p73及びIKK- $\alpha$ の複合体が含まれている）を他方の分子に対する抗体を用いた免疫学的手法（イムノブロット等）により、p73及びIKK- $\alpha$ の複合体を検出、定量することにより、p73とIKK- $\alpha$ との相互作用を測定できる。

#### 【0029】

測定の結果、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- $\alpha$ と

の相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞における p 7 3 と I K K -  $\alpha$  との相互作用よりも強い場合（タンパク質複合体の形成量が多い場合）に、当該化合物を陽性と判定する。すなわち、当該化合物はアポトーシスを促進する化合物であると判定できる。

#### 【 0 0 3 0 】

（アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法）

本発明のアポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法は、p 7 3 と I K K -  $\alpha$  との相互作用を阻害する化合物を、アポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程を備える。本スクリーニング方法は p 7 3 と I K K -  $\alpha$  とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物が得られる。

#### 【 0 0 3 1 】

具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、酵母ツーハイブリッド法や P C A 法（プロテイン・フラグメント・コンプリメンテーション・アッセイ）が挙げられる。酵母ツーハイブリッド法及び P C A 法の概要は先に説明した通りである。

#### 【 0 0 3 2 】

酵母ツーハイブリッド法を利用した本スクリーニング方法は以下の通りである。ベイトとして p 7 3 又は I K K -  $\alpha$  の一方を、プレイとして p 7 3 又は I K K -  $\alpha$  の他方を酵母に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該酵母を培養し、培養したそれぞれの酵母のレポーター遺伝子の転写活性（p 7 3 と I K K -  $\alpha$  との相互作用の強さを表す）を測定し、被検化合物存在下の転写活性が被検化合物非存在下の転写活性よりも低下している場合、被検化合物はアポトーシスを抑制する化合物であると判定できる。

#### 【 0 0 3 3 】

P C A 法を利用した本スクリーニング方法は以下の通りである。機能タンパク質の二つの断片 A 1 又は A 2 に p 7 3 又は I K K -  $\alpha$  を融合させた融合タンパク質を細胞に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該細胞を培養し、培養したそれぞれの細胞における機能タンパク質の活性を測定し、被検化合物存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性が、被検化合物非存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性よりも低下している場合、被検化合物はアポトーシスを抑制する化合物であると判定できる。

#### 【 0 0 3 4 】

本発明のアポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法は、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p 7 3 及び I K K -  $\alpha$  を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞における、p 7 3 と I K K -  $\alpha$  との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞における p 7 3 と I K K -  $\alpha$  との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞における p 7 3 と I K K -  $\alpha$  との相互作用よりも弱い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程と、を備える。本スクリーニング方法は p 7 3 と I K K -  $\alpha$  とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物が得られる。

#### 【 0 0 3 5 】

具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、免疫沈降法が挙げられる。免疫沈降法を用いたスクリーニング方法は、化合物を判定する工程を除いて先に説明したのと同様である。すなわち、p 7 3 と I K K -  $\alpha$  との相互作用測定の結果、被検化合物の存在下において培養した細胞における p 7 3 と I K K -  $\alpha$  との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞における p 7 3 と I K K -  $\alpha$  との相互作用よりも弱い場合（タンパク質複合体の形成量が少ない場合）に、当該化合物を陽性と判定する。すなわち、当該化合物はアポトーシス

を抑制する化合物であると判定できる。

#### 【0036】

(アポトーシス促進剤)

本発明のアポトーシス促進剤は、配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなる。配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質はIKK- $\alpha$ タンパク質を表す。本発明者らが見出した分子メカニズムによれば、IKK- $\alpha$ はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進する。したがって、本アポトーシス促進剤を細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを促進することが可能である。また、癌細胞、癌組織又は癌を患っている個体に本アポトーシス促進剤を接触又は投与することにより、癌の抑制・治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス促進剤は抗癌剤として用いることが可能である。本アポトーシス促進剤を接触又は投与する場合には、p73とともに接触又は投与することが好ましい。アポトーシスがより一層促進されるからである。

#### 【0037】

また、本発明のアポトーシス促進剤は、配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなる。本発明のアポトーシス促進剤は、配列番号23で表される塩基配列からなる核酸であることが好ましい。本発明者らが見出した分子メカニズムによれば、IKK- $\alpha$ はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進する。したがって、本アポトーシス促進剤を適切なベクターに組み込み、当該ベクターを細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを促進することが可能である。また、癌細胞、癌組織又は癌を患っている個体に前記ベクターを接触又は投与することにより、癌の抑制・治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス促進剤は抗癌剤として用いることが可能である。本アポトーシス促進剤を接触又は投与する場合には、p73とともに接触又は投与することが好ましい。アポトーシスがより一層促進されるからである。

#### 【0038】

(アポトーシス抑制剤)

本発明のアポトーシス抑制剤は、配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなる。配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、IKK- $\alpha$ の44番目のリジン残基がアラニン残基に置換されたIKK- $\alpha$  (K44A)タンパク質を表す。本発明者らは、IKK- $\alpha$  (K44A)はp73と結合するもののp73を安定化せず、p73が誘導するアポトーシスを抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は組織、若しくは神経変性疾患を患っている個体に本アポトーシス促進剤を接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp73を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

#### 【0039】

本発明のアポトーシス抑制剤及び配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなる。本発明者らは、IKK- $\alpha$  (K44A)はp73と結合するもののp73を安定化せず、p73が誘導するアポトーシスを抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を適切なベクターに組み込み、当該ベクターを細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は癌組織、若しくは神経変性疾患を患っている個体に前記ベクターを接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合

には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp 7 3を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

#### 【実施例】

##### 【0040】

以下、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

##### 【0041】

(細胞培養及びトランスフェクション)

アフリカミドリザル肝細胞COS7細胞及びヒト骨肉種細胞U2OS細胞は、10% (v/v) 熱不活性化ウシ胎児血清(FBS; インビトロジェン) 及びペニシリン(100 IU/mL) / ストレプトマイシン(100 µg/mL) を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM) で培養した。ヒト肺癌細胞H1299細胞及びマウス線維芽細胞L929細胞は、10% 熱不活性化FBS及び抗生剤混合物を含むRPMI 1640培地で培養した。培養物は、5% CO<sub>2</sub>の水飽和雰囲気下、37℃で維持した。

##### 【0042】

一過的なトランスフェクションを行うため、COS7細胞を50%コンフルエントになるまで培養し、FuGENE6 transfection reagent (ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ) を用いて、製造業者の説明書に従い、所定の組合せの発現プラスミドをCOS7細胞にトランスフェクトした。H1299細胞及びU2OS細胞は、製造業者の説明書に従い、LipofectAMINE transfection reagent (インビトロジェン) でトランスフェクトした。pcDNA3 empty plasmid (インビトロジェン) をブランクプラスミドとして用い、一過的なトランスフェクションで導入されるDNA量のバランスをとった。

##### 【0043】

(細胞生存アッセイ)

100 µLの完全培地を添加してある96ウェル組織培養皿に、U2OS細胞を5×10<sup>3</sup> / ウェルの密度で播き、一晩付着させた。シスプラチンの原液を0.45 µmボアサイズのフィルターでろ過滅菌し、リン酸緩衝食塩水(PBS) で希釈した。シスプラチンを最終濃度が20 µMとなるように培養物に加え、細胞の生存率を測定した。生存率は、改良3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド(MTT) アッセイを用いて、シスプラチンの添加から所定時間後に測定した。MTTアッセイは、10 µLのMTT溶液を各ウェルに添加し、培養物を37℃で1時間インキュベーションして行った。マイクロプレートリーダー(モデル450; バイオラッド) を用いて、各ウェルの570 nmにおける吸光度を測定した。

##### 【0044】

(RNA抽出及びRT-PCR)

Rneasy Mini Kit (キアゲン) を用い、製造業者のプロトコールに従って、シスプラチン(最終濃度: 20 µM) に曝したU2OS細胞から全RNAを抽出した。逆転写反応は、全RNA(5 µg) をSuperScript II reverse transcriptase (インビトロジェン) 及びランダムプライマーと混合し、42℃で1時間インキュベーションすることで行った。反応が完了したら、cDNAを水で希釈し、15 µLの反応溶液(100 µMの各デオキシヌクレオシド三リン酸、1×PCRバッファー、1 µMの各プライマー、0.2ユニットのrTaq DNA polymerase (タカラバイオ) を含む) で増幅した。

##### 【0045】

用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、以下のとおりである。

IKK-α:

(フォワード、配列番号1) 5'-CCGACTTCAGCAGAACATGA-3'

(リバーズ、配列番号2) 5'-TGGGGACAGTGAACAAGTGA-3'

IKK-β:

(フォワード、配列番号3) 5'-AACCAGCATCCAGATTGACC-3'

(リバーズ、配列番号4) 5'-CTCTAGGTGCTCCAGCGTTC-3'

IKK- $\gamma$ :

(フォワード、配列番号5) 5'-CCTCACTCCCTGTGAAGCTC-3'

(リバーズ、配列番号6) 5'-GAGACTCTTCGCCAGTACG-3'

IKB- $\alpha$ :

(フォワード、配列番号7) 5'-GCAAAATCCTGACCTGGTGT-3'

(リバーズ、配列番号8) 5'-GCTCGTCCTCTGTGAACTCC-3'

p53:

(フォワード、配列番号9) 5'-ATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAAC-3'

(リバーズ、配列番号10) 5'-ACCCCTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTG-3'

p73 $\alpha$ :

(フォワード、配列番号11) 5'-CCGGGAGAACTTTGAGATCC-3'

(リバーズ、配列番号12) 5'-ATCTTCAGGGCCCCCAGGTC-3'

p21WAF1:

(フォワード、配列番号13) 5'-CCGGGAGAACTTTGAGATCC-3'

(リバーズ、配列番号14) 5'-ATCTTCAGGGCCCCCAGGTC-3'

Bax:

(フォワード、配列番号15) 5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3'

(リバーズ、配列番号16) 5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'

GAPDH:

(フォワード、配列番号17) 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3'

(リバーズ、配列番号18) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

GAPDHの発現を測定して、内部標準とした。PCR増幅産物を、TAEバッファ（40mMのTris-C1、1mMのEDTA）中、1.5%アガロースゲルの電気泳動にて分離し、エチジウムブロマイド（ポストステイン）で可視化した。

#### 【0046】

(IKK- $\alpha$ を標識するFLAGエピトープ)

FLAGエピトープでIKK- $\alpha$ のN末端をエピトープ標識し、pcDNA3発現プラスミドにサブクローニングした。FLAG標識したIKK- $\alpha$ の発現プラスミドを得るため、IKK- $\alpha$ のコード領域をPCRで増幅した。PCRに用いたオリゴヌクレオチドプライマーは以下のとおりである。

(フォワード、配列番号19) 5'-CCGGAATTCGAGCGGGCCCCCGGGGCTGCGGC-3'

(リバーズ、配列番号20) 5'-CCGCTCGAGCGGTCATTCTGCTAACCAACTCCAATCAAGACTCAT-3'

フォワードプライマーの下線部分のヌクレオチドは、EcoRIの切断部位を表し、リバーズプライマーの下線部分のヌクレオチドは、XhoIの切断部位を表す。PCR産物をEcoRI及びXhoIで完全に消化し、pcDNA3-FLAG発現プラスミドの同一切断部位に導入し、FLAGタグの下流にインフレームとなるようにした。それは、FLAGエピトープで標識されたIKK- $\alpha$ の全長をコードする（pcDNA-FLAG-IKK- $\alpha$ ）。コンストラクトは、制限酵素による消化及びDNAシーケンシングにより確認した。

#### 【0047】

(キナーゼ活性のないIKK- $\alpha$ の変異体の作製)

PfuUltra<sup>TM</sup> High-Fidelity DNAポリメラーゼ（ストラタジーン）を用い、製造業者の説明書に従って、K44A変異をワイルドタイプのIKK- $\alpha$ に導入した。以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

5'-GGCTCTTGTGCTTTAGAGCTAAGTTCCAAAAACAGAGCGGATGGTGCCAT-3' (フォワード、配列番号21、下線部分が44番目のアミノ酸のAlaをコードする)

5'-AATTGCTATTTTGAGATCAAGTTCCCGGTGCTGGTACAGACTGACGTTCCC-3' (リバーズ、配列番号

## 【0048】

T4 DNAライゲース（タカラバイオ）の存在下、PCR産物をセルフライゲーションさせ、それらの核酸配列を決定し、期待通りの変異が存在し、かつランダム変異が存在しないことを確かめた。

## 【0049】

（イムノブロット）

細胞に全部で2  $\mu$ gの発現プラスミドを一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、溶解バッファー（pH 8.0；25 mMのTris-Cl、137 mMの塩化ナトリウム、1%のTriton X-100、1 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）、プロテアーゼインヒビターミックス（ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ）を含む）に懸濁させ、軽く超音波処理を行った。15000 rpmで10分間、遠心を行い、上清を回収し、ブラッドフォード法（バイオラッド）により、タンパク濃度を測定した。等量の細胞全体の可溶化物（タンパク量：50  $\mu$ g）をLaemmliのSDSサンプルバッファー中で煮沸して変性させ、10% SDS-ポリアクリルアミドゲル（SDS-PAGE）で分離し、10% メタノール含有トリス-グリシンバッファー中でポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜（Immobilon-P；ミリポア）に室温下にて1時間で転写した。5%の脱脂乳及び0.1%のTween 20を含むトリス緩衝生理食塩水（TBS-T）で室温にて1時間、膜をブロックをした。

## 【0050】

その後、抗FLAGモノクローナル抗体（M2；シグマ）、抗HAモノクローナル抗体（12CA5；ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ）、抗p73モノクローナル抗体（Ab-4；ネオマーカーズ）、抗p53モノクローナル抗体（DO-1；オンコジーンリサーチプロダクツ）、抗Baxモノクローナル抗体（6A7；eバイオサイエンス）、抗IKK- $\alpha$ ポリクローナル抗体（M-280；サンタクルーズバイオテクノロジー）、抗IKK- $\beta$ ポリクローナル抗体（H-470；サンタクルーズバイオテクノロジー）、抗IKK- $\gamma$ ポリクローナル抗体（FL-417；サンタクルーズバイオテクノロジー）、抗p65ポリクローナル抗体（C-20；サンタクルーズバイオテクノロジー）、抗IKB- $\alpha$ ポリクローナル抗体（C-21；サンタクルーズバイオテクノロジー）、抗アクチンポリクローナル抗体（20-33；シグマ）又は抗p21<sup>WAF1</sup>ポリクローナル抗体（H-164；サンタクルーズバイオテクノロジー）を一次抗体に用いて反応させた。一次抗体と反応させた後、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウス又は抗ウサギ二次抗体（セルシグナリングテクノロジー）をTBS-Tで2000倍に希釈したものをを用いて、室温にて1時間反応させた。enhanced chemiluminescence system（ECL；アマシャム・ファルマシア・バイオテック）を説明書に従って用いることにより、免疫反応性のタンパク質は最終的に可視化された。

## 【0051】

（細胞成分分画）

核抽出物及び細胞質抽出物を調製するため、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、溶解バッファー（pH 7.5；10 mMのTris-Cl、1 mMのEDTA、0.5%のNonidet P-40（NP-40）、1 mMのPMSF、プロテアーゼインヒビターミックス（シグマ）を含む）に懸濁させた。懸濁させた細胞を4℃にて30分間インキュベーションし、5000 rpmで10分間、遠心を行い、可溶性画分を回収した（これを細胞質抽出物とする）。不溶性画分を溶解バッファーで洗浄し、1×LaemmliのSDSサンプルバッファー（pH 6.8；62.5 mMのTris-Cl、2%のSDS、2%の $\beta$ -メルカプトエタノール、0.01%のブロモフェノールブルーを含む）に溶解して核抽出物を回収した。核及び細胞質画分を抗ラミンBモノクローナル抗体（Ab-1；オンコジーンリサーチプロダクツ）又は抗 $\alpha$ -チューブリンモノクローナル抗体（DM1A；セルシグナリングテクノロジー）を用いたイムノブロット分析に供した。

### 【0052】

(タンパク分解速度分析)

HA-p73 $\alpha$ 発現プラスミドを、IKK- $\alpha$ 発現プラスミドと一緒に又は無しに、COS7細胞に一過的にトランスフェクトした。シクロヘキシミド(最終濃度:100 $\mu$ g/mL)による前処理から所定時間後に、細胞を回収した。細胞全体の可溶化物を調製し、抗p73モノクローナル抗体又は抗アクチンポリクローナル抗体によるイムノブロット分析を行った。デンストメトリーを用いて、アクチンで規格化したHA-p73 $\alpha$ の量を定量した。

### 【0053】

(ユビキチン化アッセイ)

量を変化させたIKK- $\alpha$ 発現プラスミドの存在下又は非存在下、HA-p73 $\alpha$ 及びHA-Ubをコードする発現プラスミドを一定量、COS7細胞に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションから4時間後、プロテアソームインヒビターであるMG-132(最終濃度:20 $\mu$ M)に6時間、細胞を曝し、細胞全体の可溶化物をまず抗p73モノクローナル抗体と免疫沈降させ、次に抗HAモノクローナル抗体(12CA5;ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ)を用いたイムノブロットを行うことにより、ユビキチン化レベルを分析した。

### 【0054】

(免疫沈降分析)

細胞全体の可溶化物を15000rpmで15分間、遠心して細胞片を除いた。プロテインG-セファロース(50%スラリー、30 $\mu$ L;アマシャム・ファルマシア・バイオテック)を用いて、4℃にて30分間、得られた上清を前処理した。遠心した後、抗HAポリクローナル抗体(医学生物学研究所)又は抗FLAGモノクローナル抗体を用いて、上清を4℃にて2時間インキュベーションした。4℃にて30分間、免疫複合体をプロテインG-セファロースビーズで沈降させた。軽く遠心して回収した後、免疫沈降物を溶解バッファーで3回洗浄し、30 $\mu$ Lの2×LaemmliのSDSサンプルバッファーに懸濁させ、100℃にて5分間処理した。上清を10%SDS-PAGEにロードし、上述したようにイムノブロットで分析を行った。

### 【0055】

(GSTプルダウンアッセイ)

FLAG-IKK- $\alpha$ を発現しているCOS7細胞から調製した細胞全体の可溶化物をグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)又はGST融合タンパク質と混ぜ、グルタチオン-セファロースビーズ(アマシャム・ファルマシア・バイオテック)の存在下、4℃にて2時間、ゆっくり振盪しながらインキュベーションした。その後、軽く遠心してセファロースビーズを沈殿させ、1mMのPMSFを含むNETNバッファー(pH7.5;50mMTris-Cl、150mMの塩化ナトリウム、0.1%のNP-40、1mMのEDTA)で激しく洗浄した。結合したタンパク質は、30 $\mu$ Lの2×LaemmliのSDSサンプルバッファーを加えてビーズから溶出させ、5分間煮沸し、10%SDS-PAGEで分離した。タンパク質をPVDF膜に転写し、上述したようにFLAG-IKK- $\alpha$ でイムノブロットした。

### 【0056】

(免疫蛍光分析)

U2OS細胞をカバーガラス上で培養し、所定の発現プラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、-20℃にて20分間、100%メタノールで固定した。細胞をPBSで2回洗浄し、3%ウシ血清アルブミン(BSA)のPBS溶液(0.1%グリシン及び0.1%アジ化ナトリウムを含む)を用いて室温にて1時間ブロックした。その後、細胞をPBSで洗浄し、50倍希釈した抗ラミンBモノクローナル抗体及び200倍希釈した抗FLAGポリクローナル抗体(シグマ)を同時に用いて、室温にて1時間インキュベーションした。結合した免疫グロブリンを検出するため、200倍に希釈したローダミン又はフルオレセインイソチオシ

アネート (F I T C) 標識した二次抗体 (インビトロジェン) と、室温にて1時間、インキュベーションした。二次抗体とインキュベーションした後、カバーガラスをPBSで洗浄し、Fluoromount-G (サザンバイオテック) を用いてガラススライド上にマウントして、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス) で調べた。

#### 【0057】

(ルシフェラーゼレポーターアッセイ)

p53を欠損したH1299細胞を $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルの密度で12ウェル組織培養皿に播き、以下のもので細胞を一過的にトランスフェクトした: 100 ngのルシフェラーゼレポーターコンストラクト (p21WAF1、MDM2又はBaxプロモーターに由来するp53/p73応答配列を保有する)、10 ngのpRL-TKウミシイタケルシフェラーゼcDNA、及び25 ngの所定の発現プラスミド (p53、HA-p73 $\alpha$ 又はHA-p73 $\beta$ ) を量を変化させたIKK- $\alpha$ 又はFLAG-IKK- $\beta$ 発現プラスミドと一緒に又は無しで。p cDNA3 empty plasmidを用いて、トランスフェクションあたりのトータルのDNA量は一定 (510 ng) に保った。トランスフェクションから48時間後、細胞を氷冷したPBSで2回洗浄し、passive lysis buffer (プロメガ) に懸濁させた。デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (プロメガ) を用いて、説明書に従い、ホタル及びウミシイタケの両ルシフェラーゼ活性を測定した。蛍光強度はTD-20ルミノメーター (ターナーデザイン) を用いて測定した。ホタルルシフェラーゼのシグナルを、ウミシイタケルシフェラーゼのシグナルに基いて規格化した。少なくとも3回のトランスフェクションを行って得られた結果を、平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。

#### 【0058】

(アポトーシスアッセイ)

p73 $\alpha$ 及びIKK過剰発現を介したアポトーシスを検出するため、 $1.5 \times 10^4$ 細胞/ウェルの密度でH1299細胞を6ウェル組織培養皿に播いた。翌日、50 ngの $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現プラスミド及び50 ngのHA-p73 $\alpha$ 発現プラスミドを、量を変化させたIKK- $\alpha$ 又はIKK- $\beta$ 発現ベクター (100、200又は400 ng) の存在下又は非存在下、細胞に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、0.4%トリパンブルー (PBS溶液) で室温にて10分間染色した。その後、細胞をPBSで2回洗浄し、2.5%のグルタルアルデヒド、1 mMの塩化マグネシウム及び2 mMのEGTAを含むPBSで10分間固定し、Red-Gal (リサーチオルガニクス) を用いて、Bayon, Y. et al., Mol. Cell. Biol. 23: 1061-1074 (2003). に記載の方法で2時間染色した。トランスフェクトした細胞を可視化するためのマーカーとしてRed-Galを用い、トランスフェクタントにどのくらいアポトーシスが生じているかを評価した。Red-Gal及びトリパンブルーの二重染色によって暗いピンク〜パープルになっている細胞を集めて、アポトーシス細胞をスコア化した。結果は3回の独立したトランスフェクションそれぞれ、3回以上行っただけの平均で表した。

#### 【0059】

(実施例1) U2OS細胞におけるシスプラチンを介したアポトーシス中のIKK- $\alpha$ の誘導

DNA損傷により誘導されるシグナル伝達において、IKKキナーゼ (IKKs) の潜在的な機能を規定するため、DNAを損傷する化学療法剤であるシスプラチンにU2OS細胞をさらして、それらのタンパク質及びmRNAの発現レベルを調べた。細胞生存アッセイにより調べたところ、U2OS細胞は時間依存的にアポトーシスを起こしていた (図1)。イムノブロット分析を行ったところ、p53及びそのホモログであるp73 $\alpha$  (両者はDNA損傷応答における主要なメディエーターである (Melino, G. et al., Nat. Rev. Cancer 2: 605-615 (2002). 及び Vousden, K. H. et al., Nat. Rev. Cancer 2: 594-604 (2002).) は、シスプラチンに応答してタンパク質レベルで顕著に誘導された (図2)。その一方、p53及びp73 $\alpha$ のmRNAの発現は誘導されなかった (図3)。これ

らの蓄積は、p 21 WAF 1 や Bax のような下流のエフェクターに関連している。特に、シスプラチン処理により、IKK- $\alpha$  が顕著に蓄積し、シスプラチン曝露から 12~36 時間後の間にその誘導が認められた (図 2)。シスプラチン処理の 12 時間後、IKK- $\gamma$  (NEMO) のタンパク質レベルが一過的に上昇したが、24~36 時間までシスプラチン処理時間を延長すると IKK- $\gamma$  レベルは減少し、未処理の細胞とほとんど区別できない程度であった。対照的に、シスプラチン処理によって IKK- $\beta$  の量はほとんど変化しなかった。RT-PCR 分析の結果、IKK- $\alpha$  及び IKK- $\beta$  の mRNA の発現はシスプラチン処理で変化せず、その一方、IKK- $\gamma$  の mRNA の発現レベルは、シスプラチン処理に応じて時間依存的に、顕著な増加が認められた (図 3)。興味深いことに、イムノブロット分析の結果は、シスプラチン処理によってリン酸化型の I $\kappa$ B- $\alpha$  (特徴がよく分かっている、IKK 複合体の基質である) が顕著に増加していることを示している。

#### 【0060】

以上の結果をあわせると、DNA 損傷で誘導される p 53 及び p 73 の蓄積は IKK- $\alpha$  のアップレギュレーションと関連していること、及び、DNA 損傷が介するアポトーシス経路の間にそれらの機能的な相互作用が存在する可能性があることが示唆された。

#### 【0061】

(実施例 2) シスプラチンに応答した IKK- $\alpha$  の核内の蓄積

CRM-1 依存的に、IKK- $\alpha$  が核と細胞質との間を往復していることが、最近示された (Birbach, A. et al., J. Biol. Chem. 277: 10842-10851 (2002).)。また、核の IKK- $\alpha$  は、サイトカイン曝露後の生存経路を制御する NF- $\kappa$ B 応答遺伝子をトランス活性化する能力を有している (Yamamoto, Y. et al., Nature 423: 655-659 (2003).) 及び

Anest, V. et al., Nature 423: 659-663 (2003).)。これらを踏まえて、内在性の IKKs の細胞下の局在がシスプラチンに応じて変化するかを調べた。

#### 【0062】

シスプラチンに曝した又は未処理の U2OS 細胞から、核及び細胞質抽出物を調製し、所定の抗体とのイムノブロットに供した。核及び細胞質画分の純度は、それぞれ、抗ラミン B 抗体及び抗  $\alpha$ -チューブリン抗体を用いたイムノブロットで確認した。既報の結果と一致して、IKK- $\alpha$  は核及び細胞質の両方に局在しており、他方、IKK- $\beta$  はもっぱら細胞質で発現していた (図 4)。細胞質中の IKK- $\alpha$ 、IKK- $\beta$  及び IKK- $\gamma$  の量は、シスプラチン処理にかかわらず変化しなかった。シスプラチン処理によって、時間依存的に IKK- $\alpha$  は核内で顕著に蓄積した一方、IKK- $\beta$  は核内でそれほど蓄積しなかった。また、IKK- $\gamma$  の一過的な核内の蓄積が、シスプラチン処理の 12 時間後に認められた。シスプラチンに応答して I $\kappa$ B- $\alpha$  のリン酸化が亢進することと一致して、細胞質の I $\kappa$ B- $\alpha$  は時間依存的に減少した。しかしながら、p 65-NF $\kappa$ B サブユニット (RelA) の核内での蓄積に対して、シスプラチン処理はほとんど影響を与えなかった。このことは、シスプラチンの存在によって、p 65 の核内移行が阻害されている可能性があることを示している。このように考えると、IKKs のうち、シスプラチン処理によって IKK- $\alpha$  の顕著に核内に蓄積し、IKK- $\alpha$  はシスプラチンを介したアポトーシスの間に核内における何らかの機能を持っている可能性が考えられる。

#### 【0063】

外因的に IKK- $\alpha$  を発現させると、内在性の IKK- $\alpha$  の挙動を左右するかを調べるため、イムノブロット及び免疫蛍光染色によって外因性の IKK- $\alpha$  の細胞内分布を調べた。FLAG-IKK- $\alpha$  又は HA-p 73  $\alpha$  をコードする発現プラスミドをトランスフェクトした U2OS 細胞から、核及び細胞質画分を調製し、それぞれ、抗 FLAG 抗体又は抗 p 73 抗体を用いたイムノブロットに供した。図 5 (トランスフェクトの 48 時間後の細胞のイムノブロットの結果を表している) に示したように、HA-p 73  $\alpha$  はもっぱら核に局在しており、FLAG-IKK- $\alpha$  は、核及び細胞質の両方に存在していた。驚くべきことに、抗 FLAG 抗体及び抗ラミン抗体を用いた免疫蛍光染色の結果から、核マ

トリックスマーカであるラミンBと広範囲にわたって共存していることから示されたとおり、外因性のIKK- $\alpha$ は細胞質及び核マトリックスに局在していることがはっきりと示された(図6)。興味深いことに、HA-p73 $\alpha$ はFLAG-IKK- $\alpha$ と共存して、核マトリックスに存在しており、これは、核のIKK- $\alpha$ がアポトーシス促進性のp73と相互作用し、その機能を調整している可能性を示唆している。

#### 【0064】

(実施例3) シスプラチン曝露による、U2OS細胞におけるNF- $\kappa$ Bの活性化の変化

上述の通り、核内のトランス活性化性p65サブユニットの量は、シスプラチン処理をしたU2OS細胞において変化しなかった。これらの結果を受け、シスプラチンに応答して、NF- $\kappa$ Bが活性化するかどうかを調べた。NF- $\kappa$ BレポータープラスミドをトランスフェクトしたU2OS細胞をシスプラチンで処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。シスプラチン処理は、NF- $\kappa$ B依存性の転写活性化を亢進しなかった(図7)。マウス線維芽細胞であるL929細胞をTNF- $\alpha$ に曝すと、2時間後に、NF- $\kappa$ Bに依存した転写活性化が認められた(図8)。L929細胞は、TNF- $\alpha$ 依存性のNF- $\kappa$ Bの活性化を調べるために広く用いられている。また、L929細胞をTNF- $\alpha$ で処理すると、p65が核に顕著に蓄積する(図9)。以上から、TNF- $\alpha$ と異なり、NF- $\kappa$ B依存性の転写活性化にシスプラチンが顕著な効果を及ぼさないことは、核内のp65の蓄積が調節されないためであると考えられる。

#### 【0065】

(実施例4) IKK- $\alpha$ とp73の相互作用

哺乳動物の培養細胞において、IKK- $\alpha$ がp73と相互作用するかどうかを調べるため、トランスフェクトしたCOS7細胞から細胞全体の可溶化物を調製し、その可溶化物を抗FLAG抗体又は抗HA抗体と免疫沈降させ、それぞれ、抗p73又は抗FLAG抗体を使ったイムノブロットで分析した。図10に示したように、外因的に発現させたFLAG-IKK- $\alpha$ 及びHA-p73 $\alpha$ は、COS7細胞中で安定複合体を形成した。同様に、HA-p73 $\beta$ はFLAG-IKK- $\alpha$ と免疫共沈降した(データは示さず)。対照的に、内在性のp53の免疫沈降をし、抗FLAG抗体でイムノブロットをしたところ、免疫共沈降したFLAG-IKK- $\alpha$ は検出されなかった(図11)。これは、細胞中において、IKK- $\alpha$ はp73と相互作用するが、p53とは相互作用しないことを示している。IKK- $\alpha$ との相互作用に参与するp73の決定基を同定するため、GSTに融合したp73の欠失変異体をいくつか作製し、インビトロのプルダウンアッセイにおいてFLAG-IKK- $\alpha$ への結合能を調べた。トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、オリゴマー化ドメイン及びSAMドメインを含むp73の機能的ドメインに基づいて、これらの変異体を設計した(図12)。FLAG-IKK- $\alpha$ は、GST-p73(114-328)には結合したが、他のGST融合タンパク質には結合しなかった(図13)。以上の結果から、IKK- $\alpha$ は、p73のDNA結合ドメインを介して、直接p73と相互作用していることが示唆された。

#### 【0066】

(実験5) IKK- $\alpha$ によるp73の安定化

既に報告されているように、p73と相互作用するいくつかのプロテインキナーゼ(例えば、c-Abl及びPKC $\delta$ )は、p73を安定化することができる。IKK- $\alpha$ がp73の安定化に影響を与えるかどうか確かめるため、一定量のHA-p73 $\alpha$ 発現プラスミドを、量を変化させたIKK- $\alpha$ 発現プラスミドと一緒に又は無しに、COS7細胞にトランスフェクトし、HA-p73 $\alpha$ のタンパク質レベルを調べた。図14に示したように、外因性のIKK- $\alpha$ の存在によって、HA-p73 $\alpha$ の量は顕著に増加した一方、FLAG-p53の安定化に対しては検出可能な効果をIKK- $\alpha$ は有していなかった。さらに、HA-p73 $\beta$ もIKK- $\alpha$ によって安定化されるが、安定化の程度はHA-p73 $\alpha$ に比べれば少ない。IKK- $\alpha$ が増加した実験条件下では、p73 $\alpha$ のmRNAの発現レベルは顕著な変化を見せなかった(図14)。このことは、IKK- $\alpha$ がp73をタ

ンパク質レベルで制御していることを示唆している。次に、一過的なトランスフェクションによって、IKK- $\beta$ がp73及びp53の安定化に影響を与えるかを調べた。図15に示したように、FLAG-IKK- $\beta$ はp73及びp53の両者の安定化には検出し得る効果を有していなかった。

#### 【0067】

IKK- $\alpha$ がp73のターンオーバーを調節しているかどうかを確かめるため、トランスフェクトしたCOS7細胞におけるp73の分解速度を調べた。トランスフェクションの24時間後、細胞をシクロヘキシミドで処理した。指定した時間において、細胞全体の可溶化物を調整し、抗p73抗体を用いたイムノブロットに供した。図16に示したように、HA-p73 $\alpha$ 及びIKK- $\alpha$ の両方を発現させた細胞におけるHA-p73 $\alpha$ の分解速度は、HA-p73 $\alpha$ を単独で発現させた細胞における分解速度よりも遅かった。対照的に、FLAG-IKK- $\beta$ の存在していても、HA-p73 $\alpha$ の半減期は延びなかった(図17)。このように、IKK- $\alpha$ が仲介するp73の安定化は、p73の半減期の増加によるものである。

#### 【0068】

Lee, C.-W. et al., Oncogene 18: 4171-4181 (1999).に記載されているように、p73の定常状態のレベルは、少なくとも一部はユビキチン-プロテアソーム経路を通じたタンパク質分解過程によって調節されている。p73のユビキチン化をIKK- $\alpha$ が阻害するかどうかを調べた。HA-p73 $\alpha$ 及びHA-ユビキチン発現プラスミドを、量を変化させたIKK- $\alpha$ 又はFLAG-IKK- $\beta$ 発現プラスミドと一緒に又は無しに、COS7細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞全体の可溶化物を免疫沈降及びイムノブロットにより分析し、HA-ユビキチンを含むp73 $\alpha$ が存在するかどうかを調べた。ユビキチン化したp73 $\alpha$ の量は、IKK- $\alpha$ の存在によって減少した(図18)一方、FLAG-IKK- $\beta$ はp73 $\alpha$ のユビキチン化をいくぶん少ない程度であるが阻害した(図19)。

#### 【0069】

これらの結果を合わせると、IKK- $\alpha$ はp73のユビキチン化を阻害し、それによりp73の安定化を向上させていることが強く示唆された。

#### 【0070】

(実施例6) p53が欠損したH1299細胞における、p73が仲介するトランス活性化機能のIKK- $\alpha$ による増強

IKK- $\alpha$ 及びp73の相互作用の機能的な意味を探るため、まず、p73が仲介する転写活性化に及ぼすIKK- $\alpha$ の効果を調べた。p53が欠損したH1299細胞に、HA-p73 $\alpha$ 又はHA-p73 $\beta$ 発現プラスミド、及びp21<sup>WAF1</sup>、Bax又はMDM2プロモーターのコントロール下のルシフェラーゼレポーターコンストラクトを、量を変化させたIKK- $\alpha$ の発現プラスミドと一緒に又は無しにトランスフェクトした。図20及び21に示したように、エンブティプラスミドの対照に比べて、異所的に発現したp73は、p53/p73応答性レポーターの転写を活性化した。また、IKK- $\alpha$ 単独では、ルシフェラーゼ活性にはほとんど影響を与えなかった。HA-p73 $\alpha$ 又はHA-p73 $\beta$ をIKK- $\alpha$ と共発現させたときは、p73依存的な転写活性化の顕著な増加が、用量依存的に認められた。対照的に、p53応答レポーター遺伝子活性の増加は、IKK- $\alpha$ によって誘導されなかった(図22)。IKK- $\alpha$ によって仲介されるp73依存性の転写の活性化の特異性を調べるため、IKK- $\beta$ がp53/p73応答性プロモーターに対するp73転写活性を増強するかどうかを確かめた。図23に示したように、FLAG-IKK- $\beta$ によって、p73依存性の転写活性化に顕著な変化は認められなかった。さらに、H1299細胞に外因的にIKK- $\alpha$ を発現させたところ、p73 $\alpha$ が仲介する内在性のp21<sup>WAF1</sup>の誘導が顕著にアップレギュレートした(図24)。

#### 【0071】

これらの結果をあわせると、IKK- $\alpha$ はp73の転写活性を特異的に増強していることが示唆された。

### 【0072】

(実施例7) p73を介したアポトーシスに対するIKK- $\alpha$ の寄与

アポトーシスの調節のようなp73依存性の生物学的機能に対するIKK- $\alpha$ の潜在的な効果を調べた。一定量のHA-p73 $\alpha$ 及び $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現プラスミドを、量を変化させたIKK- $\alpha$ 又はFLAG-IKK- $\beta$ 発現プラスミドと一緒に又は無しに、H1299細胞に一過的にトランスフェクトした。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現プラスミドはトランスフェクトした細胞を同定するために使用した。トランスフェクションの48時間後、トリパンブルー（生育不能細胞）及びRed-Gal（トランスフェクトした細胞）を用いた二重染色に細胞を供し、紫色の細胞の数をスコア化した。図25及び26に示したように、IKK- $\alpha$ をHA-p73 $\alpha$ と共発現させると、HA-p73 $\alpha$ 単独でトランスフェクトした場合に比べて、アポトーシスを起こした細胞の数が増加していた。対照的に、FLAG-IKK- $\beta$ の共発現は、p73 $\alpha$ 依存性のアポトーシスには顕著な効果を及ぼさなかった（図27）。

### 【0073】

これらのデータは、p73依存性の転写活性化に対するIKK- $\alpha$ の正の効果と一致している。

### 【0074】

(実施例8) キナーゼ活性を欠損した変異型IKK- $\alpha$ がp73の安定化に及ぼす影響

IKK- $\alpha$ の内在的なキナーゼ活性がp73の安定化に必要なかどうかを調べるため、変異型のIKK- $\alpha$ であるIKK- $\alpha$  (K44A)を作製した。この変異体は、ATP結合モチーフ中のリジン-44がアラニンに置換されている。Ling, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3792-3797 (1998).に記載されているとおり、この部位を変異すると、IKK- $\alpha$ のキナーゼ活性が損なわれる。免疫沈降分析から分かるように、哺乳動物の培養細胞において、IKK- $\alpha$  (K44A)は、p73 $\alpha$ との複合体を形成する能力は維持している（図28）。ワイルドタイプのIKK- $\alpha$ とは極めて対照的に、FLAG-IKK- $\alpha$  (K44A)の共発現は、外因的に発現させたHA-p73 $\alpha$ の細胞内レベルにはほとんど影響を及ぼさなかった（図29）。内在性のp73に対する、キナーゼ活性を欠損したIKK- $\alpha$ の効果を調べるため、U2OS細胞又はH1299細胞に、エンブレティプラスミド又はFLAG-IKK- $\alpha$  (K44A)の発現プラスミドを一過的にトランスフェクトし、シスプラチンに24時間曝すか、未処理のままにした。細胞全体の可溶化物及び全RNAを調製し、それぞれ、イムノブロット及びRT-PCRに供した。図30に示したように、FLAG-IKK- $\alpha$  (K44A)発現プラスミドをトランスフェクトしたU2OS細胞において、シスプラチンを介した内在性のp73 $\alpha$ の安定化が阻害された。その一方、FLAG-IKK- $\alpha$  (K44A)は、内在性のp53の量には顕著な影響を与えなかった。同じような結果は、p53を欠損したH1299細胞においても得られた（図32）。上記結果とよく一致するように、FLAG-IKK- $\alpha$  (K44A)の存在下、シスプラチンで誘導されるアポトーシスが顕著に阻害された（図31及び33）。

### 【0075】

このように、シスプラチンに誘導されるDNA損傷に応答するp73の安定化には、IKK- $\alpha$ のキナーゼ活性が必要であると考えられる。

### 【図面の簡単な説明】

### 【0076】

【図1】骨肉種細胞U2OS細胞をシスプラチンに曝したときの細胞生存率を表すグラフである。

【図2】シスプラチン処理したU2OS細胞の細胞可溶化物のイムノブロットの結果を表す図である。

【図3】シスプラチン処理したU2OS細胞からのRNAをRT-PCR分析した結果を表す図である。

【図4】シスプラチン処理したU2OS細胞の核画分（N）及び細胞質画分（C）のイムノプロットの結果を表す図である。

【図5】FLAG-IKK- $\alpha$ 又はHA-p73 $\alpha$ 発現プラスミドをトランスフェクトしたU2OS細胞の核画分（N）及び細胞質画分（C）のイムノプロットの結果を表す図である。

【図6】FLAG-IKK- $\alpha$ 発現プラスミドを単独で（上段の3つの写真）又はHA-p73 $\alpha$ と一緒に（下段の3つの写真）一過的にトランスフェクトしたU2OS細胞の関節免疫蛍光で二重染色した結果を表す写真である。マージは、FLAG-IKK- $\alpha$ 及びラミンB、又は、HA-p73 $\alpha$ 及びFLAG-IKK- $\alpha$ の写真を併せた写真を表している。

【図7】U2OS細胞をシスプラチン処理したときの、NF- $\kappa$ Bの活性化倍率を表すグラフである。

【図8】L929細胞をTNF- $\alpha$ 処理したときの、NF- $\kappa$ Bの活性化倍率を表すグラフである。

【図9】TNF- $\alpha$ に曝されたL929細胞の核画分（N）及び細胞質画分（C）のイムノプロットの結果を表す図である。IKK- $\alpha$ 及びp73の相互作用

【図10】所定の組合せの発現プラスミドを一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を免疫沈降及びイムノプロットした結果を表す図である。IPは免疫沈降に用いた抗体を、IBはイムノプロットに用いた抗体を、それぞれ表す。

【図11】FLAG-IKK- $\alpha$ 発現プラスミドを一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を、正常マウス血清（NMS）又は抗p53抗体使った免疫沈降、及び、抗FLAG抗体を使ったイムノプロットした結果を表す図である。

【図12】GST-p73融合タンパク質の模式図である。TAはトランス活性化ドメインを、DBはDNA結合ドメインを、ODはオリゴマー化ドメインを、SAMはステライル $\alpha$ モチーフドメインを表す。

【図13】上図は、インビトロブルダウンアッセイにおいて、抗FLAG抗体を使ったイムノプロットの結果を表す図である。下図は、インビトロブルダウンアッセイにおいて、抗GST抗体を使ったイムノプロットの結果を表す図である。

【図14】所定の組合せの発現プラスミドをCOS7細胞に一過的にコトランスフェクトしたときの、イムノプロット（上図）又はRT-PCR（下図）の結果を表す図である。

【図15】所定の組合せの発現プラスミドをCOS7細胞に一過的にコトランスフェクトしたときの、イムノプロットの結果を表す図である。

【図16】上図は、HA-p73 $\alpha$ 発現プラスミドを、単独で又はIKK- $\alpha$ 発現プラスミドと一緒に、一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を、シクロヘキシミド（CHX）処理したときの、イムノプロットの結果を表す図である。下図は、残存しているHA-p73 $\alpha$ を表したグラフである。

【図17】上図は、HA-p73 $\alpha$ 発現プラスミドを、単独で又はIKK- $\beta$ 発現プラスミドと一緒に、一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を、シクロヘキシミド（CHX）処理したときの、イムノプロットの結果を表す図である。下図は、残存しているHA-p73 $\alpha$ を表したグラフである。

【図18】HA-p73 $\alpha$ 及びHA-Ub発現プラスミドを、量を変化させたIKK- $\alpha$ 発現プラスミドと一緒に又は無しに、一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞をMG-132で処理し、抗p73抗体で免疫沈降し、抗HA抗体でイムノプロットした結果を表す図である。Ub $\times$ n-p73 $\alpha$ は、ゆっくり泳動しているユビキチン化型のHA-p73 $\alpha$ を表す。

【図19】HA-p73 $\alpha$ 及びHA-Ub発現プラスミドを、量を変化させたIKK- $\beta$ 発現プラスミドと一緒に又は無しに、一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞をMG-132で処理し、抗p73抗体で免疫沈降し、抗HA抗体でイムノプロットした結果を表す図である。Ub $\times$ n-p73 $\alpha$ は、ゆっくり泳動しているユビキ

チン化型のHA-p73 $\alpha$ を表す。

【図20】HA-p73 $\alpha$ をコードする発現プラスミドを、p21WAF1、Bax又はMDM2プロモーター由来のp53応答配列を運ぶルシフェラーゼレポーター、ウミシイタケルシフェラーゼプラスミド(pRL-TK)とともに、量を変化させたpcDNA3-IKK- $\alpha$ の存在下又は非存在下、一過的にコトランスフェクトしたp-53欠損H1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

【図21】HA-p73 $\beta$ をコードする発現プラスミドを、p21WAF1、Bax又はMDM2プロモーター由来のp53応答配列を運ぶルシフェラーゼレポーター、ウミシイタケルシフェラーゼプラスミド(pRL-TK)とともに、量を変化させたpcDNA3-IKK- $\alpha$ の存在下又は非存在下、一過的にコトランスフェクトしたp-53欠損H1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

【図22】p53をコードする発現プラスミドを、p21WAF1、Bax又はMDM2プロモーター由来のp53応答配列を運ぶルシフェラーゼレポーター、ウミシイタケルシフェラーゼプラスミド(pRL-TK)とともに、量を変化させたpcDNA3-IKK- $\alpha$ の存在下又は非存在下、一過的にコトランスフェクトしたp-53欠損H1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

【図23】HA-p73 $\alpha$ 発現プラスミドを、所定のルシフェラーゼレポーターコンストラクトとともに、量を変化させたIKK- $\beta$ 発現プラスミドの存在下又は非存在下、一過的にトランスフェクトしたH1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

【図24】一定量のHA-p73 $\alpha$ 発現プラスミドを、量を変化させたIKK- $\alpha$ 発現プラスミドと一緒に又は無しに、一過的にコトランスフェクトしたH1299細胞のイムノプロットの結果を表す図である。

【図25】所定の発現プラスミドを一過的にトランスフェクションしたH1299細胞を二重染色した写真である。

【図26】所定の発現プラスミドを一過的にトランスフェクションしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

【図27】所定の発現プラスミドを一過的にトランスフェクションしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

【図28】所定の発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞に対して免疫沈降及びイムノプロットを行った結果を表す図である。

【図29】所定の発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞に対して免疫沈降及びイムノプロットを行った結果を表す図である。

【図30】FLAG-IKK- $\alpha$  (K44A)をトランスフェクトした／しないU2OS細胞をシスプラチンで処理した／処理しなかったときの、イムノプロット(上図)及びRT-PCR分析(下図)の結果を表す図である。

【図31】 $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現プラスミドを、FLAG-IKK- $\alpha$  (K44A)発現プラスミドと一緒に又は無しに、トランスフェクトしたU2OS細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

【図32】FLAG-IKK- $\alpha$  (K44A)をトランスフェクトした／しないH1299細胞をシスプラチンで処理した／処理しなかったときの、イムノプロット(上図)及びRT-PCR分析(下図)の結果を表す図である。

【図33】 $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現プラスミドを、FLAG-IKK- $\alpha$  (K44A)発現プラスミドと一緒に又は無しに、トランスフェクトしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

【図34】DNA損傷により誘導されるアポトーシス中の、IKK、p73及びNF- $\kappa$ Bの模式図を表す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Screening methods for pro-apoptotic compounds or anti-apoptotic compounds  
, an apoptosis accelerator and an apoptosis inhibitor

<130> 1063

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha

<400> 1

ccgacttcag cagaacatga

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha

<400> 2

tggggacagt gaacaagtga

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-beta

<400> 3

aaccagcatc cagattgacc

20

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for IKK-beta

<400> 4  
ctctaggtcg tccagcgttc 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for IKK-gamma

<400> 5  
cctcactccc tgtgaagctc 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for IKK-gamma

<400> 6  
gagactcttc gcccagtagc 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for IKB-alpha

<400> 7  
gcaaaatcct gacctggtgt 20

<210> 8  
<211> 20

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for IκB-α

<400> 8  
gctcgtcctc tgtgaactcc 20

<210> 9  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for p53

<400> 9  
atttgatgct gtccccggac gatattgaac 30

<210> 10  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for p53

<400> 10  
accctttttg gacttcagggt ggctggagtg 30

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for p73-α

<400> 11  
ccgggagAAC tttagatcc 20

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> primer for p73-alpha

<400> 12

atcttcaggg cccccaggtc

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for p21WAF1

<400> 13

ccgggagAAC ttTgagatcc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for p21WAF1

<400> 14

atcttcaggg cccccaggtc

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for Bax

<400> 15

tttgcttcag ggtttcatcc

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for Bax

<400> 16

cagttgaagt tgccgtcaga

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for GAPDH

<400> 17

acctgacctg ccgtctagaa

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for GAPDH

<400> 18

tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha

<400> 19

ccggaattcg agcggccccc ggggctgcgg c

31

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha

<400> 20  
ccgctcgagc ggtcattctg ctaaccaact ccaatcaaga ctcac 45

<210> 21  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for IKK-alpha(K44A)

<400> 21  
gcgtcttgct gtttagagct aagttccaaa aacagagagc gatgggtgccac t 51

<210> 22  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for IKK-alpha(K44A)

<400> 22  
aatlgctatt ttgagatcaa gttcccgggtg ctgggtacaga ctgacgttcc c 51

<210> 23  
<211> 3579  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 23  
cacgcgtccg cgagaaggag gactcgcaag cctcggcggc ccggaaccgg cctcggactg 60  
tcgacggaac ctgaggccgc ttgccctccc gcccacatgga gcggcccccg gggctgcggc 120  
cgggcgcggg cgggccctgg gagatgcggg agcggctggg caccggcggc ttcgggaacg 180  
tctgtctgta ccagcatcgg gaacttgatc tcaaaatagc aattaagtct tgtcgccatg 240  
agctaagtac caaaaacaga gaacgatggg gccatgaaat ccagattatg aagaagttga 300  
accatgccaa tgttgtaaaag gcctgtgatg ttccctgaaga attgaatatt ttgattcatg 360  
atgtgcctct tctagcaatg gaatactggt ctggaggaga tctccgaaag ctgctcaaca 420  
aaccagaaaa ttgttgtgga cttaaagaaa gccagatact ttctttacta agtgatatag 480

ggctctgggat	tcgatatattg	catgaaaaca	aaattataca	tcgagatcta	aaacctgaaa	540
acatagtctt	tcaggatggt	ggtggaaaga	taatacataa	aataattgat	ctgggatatg	600
ccaaagatgt	tgatcaagga	agtcctgtgt	catcttttgt	gggaacactg	cagtatctgg	660
ccccagagct	ctttgagaat	aagccttaca	cagccactgt	tgattattgg	agctttggga	720
ccatgggtatt	tgaatgtatt	gctggatata	ggcctttttt	gcatcatctg	cagccattta	780
cctggcatga	gaagattaa	aagaaggatc	caaagtgtat	atttgcatgt	gaagagatgt	840
caggagaagt	tcggtttagt	agccatttac	ctcaaccaa	tagcctttgt	agtttaatat	900
tagaaccat	ggaaaactgg	ctacagttga	tgttgaaatt	ggaccctcag	cagagaggag	960
gacctgttga	ccttactttg	aagcagccaa	gatgttttgt	attaatggat	cacattttga	1020
atttgaagat	agtacacatc	ctaaatatga	cttctgcaaa	gataatttct	tttctgttac	1080
cacctgatga	aagtcctcat	tcactacagt	ctcgtattga	gcgtgaaact	ggaataaata	1140
ctggttctca	agaacttctt	tcagagacag	gaatttctct	ggatcctcgg	aaaccagcct	1200
ctcaatgtgt	tctagatgga	gttagaggct	gtgatagcta	tatggtttat	ttgtttgata	1260
aaagtaaaac	tgtatatgaa	gggccatttg	cttcacaga	tttatctgat	tgtgtaaaatt	1320
atatattgtaca	ggacagcaaa	atacagcttc	caattataca	gctgcgtaaa	gtgtgggctg	1380
aagcagtgca	ctatgtgtct	ggactaaaag	aagactatag	caggctcttt	cagggacaaa	1440
gggcagcaat	gttaagtctt	cttagatata	atgctaactt	aacaaaaatg	aagaacactt	1500
tgatctcagc	atcacaacaa	ctgaaagcta	aatggagtt	ttttcacaaa	agcattcagc	1560
ttgacttgga	gagatacagc	gagcagatga	cgtatgggat	atcttcagaa	aaaatgctaa	1620
aagcatggaa	agaaatggaa	gaaaaggcca	tccactatgc	tgaggttggg	gtcattggat	1680
acctggagga	tcagattatg	tctttgcatg	ctgaaatcat	ggagctacag	aagagccctt	1740
atggaagacg	tcaggggagac	ttgatggaat	ctctggaaca	gcgtgccatt	gatctatata	1800
agcagttaaa	acacagacct	tcagatcact	cctacagtga	cagcacagag	atggtgaaaa	1860
tcatgttgca	cactgtgcag	agtcaggacc	gtgtgctcaa	ggagctgttt	ggtcatttga	1920
gcaagttgtt	gggctgtaag	cagaagatta	ttgatctact	ccctaagggtg	gaagtggccc	1980

tcagtaatat	caaagaagct	gacaatactg	tcatgttcat	gcagggaaaa	aggcagaaag	2040
aaatatggca	tctccttaaa	attgcctgta	cacagagttc	tgcccgggtcc	cttgtaggat	2100
ccagtctaga	agggtgcagta	acccctcaga	catcagcatg	gctgcccccg	acttcagcag	2160
aacatgatca	ttctctgtca	tgtgtggtaa	ctcctcaaga	tggggagact	tcagcacaaa	2220
tgatagaaga	aaatttgaac	tgcccttggcc	atttaagcac	tattattcat	gaggcaaatg	2280
aggaacaggg	caatagtatg	atgaatcctg	attggagtth	gttaacagaa	tgagttgtca	2340
cttgttcact	gtccccaaac	ctatggaagt	tgttgctata	catgttggaa	atgtgttttt	2400
cccccatgaa	accattcttc	agacatcagt	caatggaaga	aatggctatg	aacagaaact	2460
acatttctac	tatgatcaga	agaacatgat	tttacaagta	taacagtttt	gagtaattca	2520
agcctctaaa	cagacaggaa	tttagaaaaa	gtcaatgtac	ttgtttgaat	atttgtttta	2580
ataccacagc	tatttagaag	catcatcacg	acacatttgc	cttcagtcct	ggtaaaacat	2640
tacttattta	actgattaaa	aataccttct	atgtattagt	gtcaactttt	aacttttggg	2700
cgtaaagaaa	agtgtagttt	tgtatacaga	gaagaaaacc	tcaagtaata	ggcattttta	2760
gtaaaagtct	acctgtgttt	tttcttaaaa	aggctgctca	caagttctat	ttcttgaaga	2820
ataaattcta	cctccttgth	ttgcactgaa	caggttctct	tcctggcatc	ataaggagtt	2880
ggtgtaatca	ttttaaatth	cactgaaaaa	ttaacagtat	cccccttcta	tcgaagggat	2940
tgtgtatctg	tgcttctaath	attagttggc	tttcataaat	catgttgttg	tgtgtatatg	3000
tatttaagat	gtacatttaa	taatatcaaa	gagaagatgc	ctgttaattt	ataatgtatt	3060
tgaaaattac	atgttttttc	atttgtaaaa	atgagtcatt	tgtttaaaaca	atctttcatg	3120
tcttgtcata	caaattttata	aaggctctgca	ctcctttatc	tgtaattgta	attccaaaaa	3180
ccaaaaagct	ctgaaaacaa	ggtttccata	agcttgggtga	caaaaattcat	ttgcttgcaa	3240
tetaatctga	actgaccttg	aatctttttta	tcccatttag	tgtgaatatt	cctttatttt	3300
gctgcttgat	gatgagaggg	agggctgctg	ccacagactg	tggtgagggc	tggttaatgt	3360
agtatgggat	atgcacaaaa	ctacttttct	aaaatctaaa	atttcataat	tctgaaacaa	3420
cttgcccca	gggttttcaga	gaaaggactg	tggacctcta	tcatctgcta	agtaatttag	3480

aagatattat ttgtcttaaa aaatgtgaaa tgcttttata ttctaatagt ttttcacttt 3540

gtgtattaaa tggtttttaa attaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3579

<210> 24

<211> 745

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Glu Arg Pro Pro Gly Leu Arg Pro Gly Ala Gly Gly Pro Trp Glu  
1 5 10 15

Met Arg Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asn Val Cys Leu Tyr  
20 25 30

Gln His Arg Glu Leu Asp Leu Lys Ile Ala Ile Lys Ser Cys Arg Leu  
35 40 45

Glu Leu Ser Thr Lys Asn Arg Glu Arg Trp Cys His Glu Ile Gln Ile  
50 55 60

Met Lys Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Lys Ala Cys Asp Val Pro  
65 70 75 80

Glu Glu Leu Asn Ile Leu Ile His Asp Val Pro Leu Leu Ala Met Glu  
85 90 95

Tyr Cys Ser Gly Gly Asp Leu Arg Lys Leu Leu Asn Lys Pro Glu Asn  
100 105 110

Cys Cys Gly Leu Lys Glu Ser Gln Ile Leu Ser Leu Leu Ser Asp Ile  
115 120 125

Gly Ser Gly Ile Arg Tyr Leu His Glu Asn Lys Ile Ile His Arg Asp  
130 135 140

Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu Gln Asp Val Gly Gly Lys Ile Ile  
145 150 155 160

His	Lys	Ile	Ile	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Lys	Asp	Val	Asp	Gln	Gly	Ser		
				165					170					175			
Leu	Cys	Thr	Ser	Phe	Val	Gly	Thr	Leu	Gln	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Leu		
			180					185					190				
Phe	Glu	Asn	Lys	Pro	Tyr	Thr	Ala	Thr	Val	Asp	Tyr	Trp	Ser	Phe	Gly		
		195					200					205					
Thr	Met	Val	Phe	Glu	Cys	Ile	Ala	Gly	Tyr	Arg	Pro	Phe	Leu	His	His		
	210					215					220						
Leu	Gln	Pro	Phe	Thr	Trp	His	Glu	Lys	Ile	Lys	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys		
225					230					235					240		
Cys	Ile	Phe	Ala	Cys	Glu	Glu	Met	Ser	Gly	Glu	Val	Arg	Phe	Ser	Ser		
				245					250					255			
His	Leu	Pro	Gln	Pro	Asn	Ser	Leu	Cys	Ser	Leu	Ile	Val	Glu	Pro	Met		
			260					265					270				
Glu	Asn	Trp	Leu	Gln	Leu	Met	Leu	Asn	Trp	Asp	Pro	Gln	Gln	Arg	Gly		
		275					280					285					
Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Thr	Leu	Lys	Gln	Pro	Arg	Cys	Phe	Val	Leu	Met		
	290					295					300						
Asp	His	Ile	Leu	Asn	Leu	Lys	Ile	Val	His	Ile	Leu	Asn	Met	Thr	Ser		
305					310					315					320		
Ala	Lys	Ile	Ile	Ser	Phe	Leu	Leu	Pro	Pro	Asp	Glu	Ser	Leu	His	Ser		
				325					330					335			
Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Glu	Arg	Glu	Thr	Gly	Ile	Asn	Thr	Gly	Ser	Gln		
			340					345					350				

Glu Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile Ser Leu Asp Pro Arg Lys Pro Ala  
355 360 365

Ser Gln Cys Val Leu Asp Gly Val Arg Gly Cys Asp Ser Tyr Met Val  
370 375 380

Tyr Leu Phe Asp Lys Ser Lys Thr Val Tyr Glu Gly Pro Phe Ala Ser  
385 390 395 400

Arg Ser Leu Ser Asp Cys Val Asn Tyr Ile Val Gln Asp Ser Lys Ile  
405 410 415

Gln Leu Pro Ile Ile Gln Leu Arg Lys Val Trp Ala Glu Ala Val His  
420 425 430

Tyr Val Ser Gly Leu Lys Glu Asp Tyr Ser Arg Leu Phe Gln Gly Gln  
435 440 445

Arg Ala Ala Met Leu Ser Leu Leu Arg Tyr Asn Ala Asn Leu Thr Lys  
450 455 460

Met Lys Asn Thr Leu Ile Ser Ala Ser Gln Gln Leu Lys Ala Lys Leu  
465 470 475 480

Glu Phe Phe His Lys Ser Ile Gln Leu Asp Leu Glu Arg Tyr Ser Glu  
485 490 495

Gln Met Thr Tyr Gly Ile Ser Ser Glu Lys Met Leu Lys Ala Trp Lys  
500 505 510

Glu Met Glu Glu Lys Ala Ile His Tyr Ala Glu Val Gly Val Ile Gly  
515 520 525

Tyr Leu Glu Asp Gln Ile Met Ser Leu His Ala Glu Ile Met Glu Leu  
530 535 540

Gln Lys Ser Pro Tyr Gly Arg Arg Gln Gly Asp Leu Met Glu Ser Leu  
545 550 555 560

Glu Gln Arg Ala Ile Asp Leu Tyr Lys Gln Leu Lys His Arg Pro Ser  
565 570 575

Asp His Ser Tyr Ser Asp Ser Thr Glu Met Val Lys Ile Ile Val His  
580 585 590

Thr Val Gln Ser Gln Asp Arg Val Leu Lys Glu Leu Phe Gly His Leu  
595 600 605

Ser Lys Leu Leu Gly Cys Lys Gln Lys Ile Ile Asp Leu Leu Pro Lys  
610 615 620

Val Glu Val Ala Leu Ser Asn Ile Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Met  
625 630 635 640

Phe Met Gln Gly Lys Arg Gln Lys Glu Ile Trp His Leu Leu Lys Ile  
645 650 655

Ala Cys Thr Gln Ser Ser Ala Arg Ser Leu Val Gly Ser Ser Leu Glu  
660 665 670

Gly Ala Val Thr Pro Gln Thr Ser Ala Trp Leu Pro Pro Thr Ser Ala  
675 680 685

Glu His Asp His Ser Leu Ser Cys Val Val Thr Pro Gln Asp Gly Glu  
690 695 700

Thr Ser Ala Gln Met Ile Glu Glu Asn Leu Asn Cys Leu Gly His Leu  
705 710 715 720

Ser Thr Ile Ile His Glu Ala Asn Glu Glu Gln Gly Asn Ser Met Met  
725 730 735

Asn Leu Asp Trp Ser Trp Leu Thr Glu  
740 745

<210> 25  
<211> 745  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> IKK-alpha (K44A)

<400> 25

Met Glu Arg Pro Pro Gly Leu Arg Pro Gly Ala Gly Gly Pro Trp Glu  
1 5 10 15

Met Arg Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asn Val Cys Leu Tyr  
20 25 30

Gln His Arg Glu Leu Asp Leu Lys Ile Ala Ile Ala Ser Cys Arg Leu  
35 40 45

Glu Leu Ser Thr Lys Asn Arg Glu Arg Trp Cys His Glu Ile Gln Ile  
50 55 60

Met Lys Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Lys Ala Cys Asp Val Pro  
65 70 75 80

Glu Glu Leu Asn Ile Leu Ile His Asp Val Pro Leu Leu Ala Met Glu  
85 90 95

Tyr Cys Ser Gly Gly Asp Leu Arg Lys Leu Leu Asn Lys Pro Glu Asn  
100 105 110

Cys Cys Gly Leu Lys Glu Ser Gln Ile Leu Ser Leu Leu Ser Asp Ile  
115 120 125

Gly Ser Gly Ile Arg Tyr Leu His Glu Asn Lys Ile Ile His Arg Asp  
130 135 140

Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu Gln Asp Val Gly Gly Lys Ile Ile  
145 150 155 160

His Lys Ile Ile Asp Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Val Asp Gln Gly Ser  
165 170 175

Leu Cys Thr Ser Phe Val Gly Thr Leu Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Leu  
180 185 190

Phe Glu Asn Lys Pro Tyr Thr Ala Thr Val Asp Tyr Trp Ser Phe Gly  
195 200 205

Thr Met Val Phe Glu Cys Ile Ala Gly Tyr Arg Pro Phe Leu His His  
210 215 220

Leu Gln Pro Phe Thr Trp His Glu Lys Ile Lys Lys Lys Asp Pro Lys  
225 230 235 240

Cys Ile Phe Ala Cys Glu Glu Met Ser Gly Glu Val Arg Phe Ser Ser  
245 250 255

His Leu Pro Gln Pro Asn Ser Leu Cys Ser Leu Ile Val Glu Pro Met  
260 265 270

Glu Asn Trp Leu Gln Leu Met Leu Asn Trp Asp Pro Gln Gln Arg Gly  
275 280 285

Gly Pro Val Asp Leu Thr Leu Lys Gln Pro Arg Cys Phe Val Leu Met  
290 295 300

Asp His Ile Leu Asn Leu Lys Ile Val His Ile Leu Asn Met Thr Ser  
305 310 315 320

Ala Lys Ile Ile Ser Phe Leu Leu Pro Pro Asp Glu Ser Leu His Ser  
325 330 335

Leu Gln Ser Arg Ile Glu Arg Glu Thr Gly Ile Asn Thr Gly Ser Gln  
340 345 350

Glu Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile Ser Leu Asp Pro Arg Lys Pro Ala  
355 360 365

Ser	Gln	Cys	Val	Leu	Asp	Gly	Val	Arg	Gly	Cys	Asp	Ser	Tyr	Met	Val		
370						375					380						
Tyr	Leu	Phe	Asp	Lys	Ser	Lys	Thr	Val	Tyr	Glu	Gly	Pro	Phe	Ala	Ser		
385					390					395						400	
Arg	Ser	Leu	Ser	Asp	Cys	Val	Asn	Tyr	Ile	Val	Gln	Asp	Ser	Lys	Ile		
				405					410						415		
Gln	Leu	Pro	Ile	Ile	Gln	Leu	Arg	Lys	Val	Trp	Ala	Glu	Ala	Val	His		
			420					425						430			
Tyr	Val	Ser	Gly	Leu	Lys	Glu	Asp	Tyr	Ser	Arg	Leu	Phe	Gln	Gly	Gln		
		435					440						445				
Arg	Ala	Ala	Met	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Tyr	Asn	Ala	Asn	Leu	Thr	Lys		
	450					455						460					
Met	Lys	Asn	Thr	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Lys	Leu		
465					470					475					480		
Glu	Phe	Phe	His	Lys	Ser	Ile	Gln	Leu	Asp	Leu	Glu	Arg	Tyr	Ser	Glu		
				485					490						495		
Gln	Met	Thr	Tyr	Gly	Ile	Ser	Ser	Glu	Lys	Met	Leu	Lys	Ala	Trp	Lys		
			500					505						510			
Glu	Met	Glu	Glu	Lys	Ala	Ile	His	Tyr	Ala	Glu	Val	Gly	Val	Ile	Gly		
		515					520					525					
Tyr	Leu	Glu	Asp	Gln	Ile	Met	Ser	Leu	His	Ala	Glu	Ile	Met	Glu	Leu		
	530					535						540					
Gln	Lys	Ser	Pro	Tyr	Gly	Arg	Arg	Gln	Gly	Asp	Leu	Met	Glu	Ser	Leu		
545					550					555					560		

Glu Gln Arg Ala Ile Asp Leu Tyr Lys Gln Leu Lys His Arg Pro Ser  
565 570 575

Asp His Ser Tyr Ser Asp Ser Thr Glu Met Val Lys Ile Ile Val His  
580 585 590

Thr Val Gln Ser Gln Asp Arg Val Leu Lys Glu Leu Phe Gly His Leu  
595 600 605

Ser Lys Leu Leu Gly Cys Lys Gln Lys Ile Ile Asp Leu Leu Pro Lys  
610 615 620

Val Glu Val Ala Leu Ser Asn Ile Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Met  
625 630 635 640

Phe Met Gln Gly Lys Arg Gln Lys Glu Ile Trp His Leu Leu Lys Ile  
645 650 655

Ala Cys Thr Gln Ser Ser Ala Arg Ser Leu Val Gly Ser Ser Leu Glu  
660 665 670

Gly Ala Val Thr Pro Gln Thr Ser Ala Trp Leu Pro Pro Thr Ser Ala  
675 680 685

Glu His Asp His Ser Leu Ser Cys Val Val Thr Pro Gln Asp Gly Glu  
690 695 700

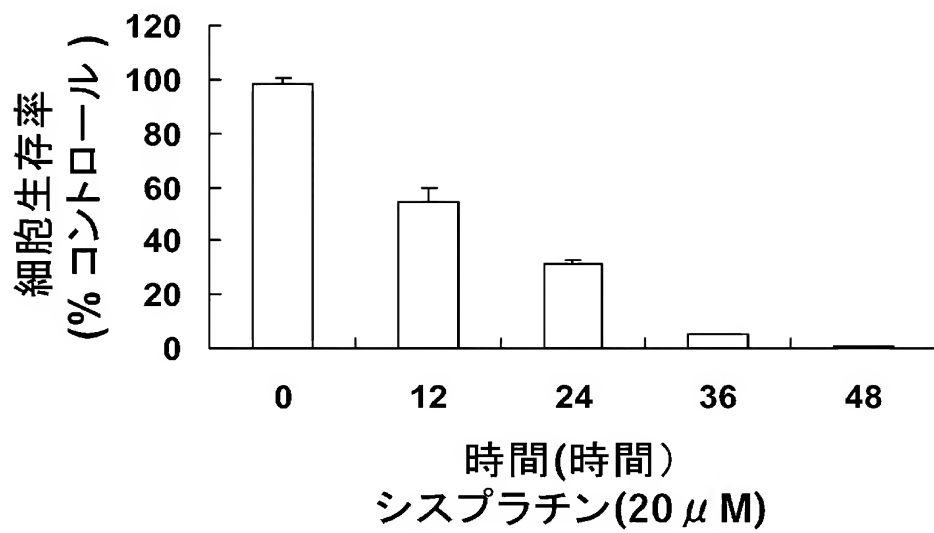
Thr Ser Ala Gln Met Ile Glu Glu Asn Leu Asn Cys Leu Gly His Leu  
705 710 715 720

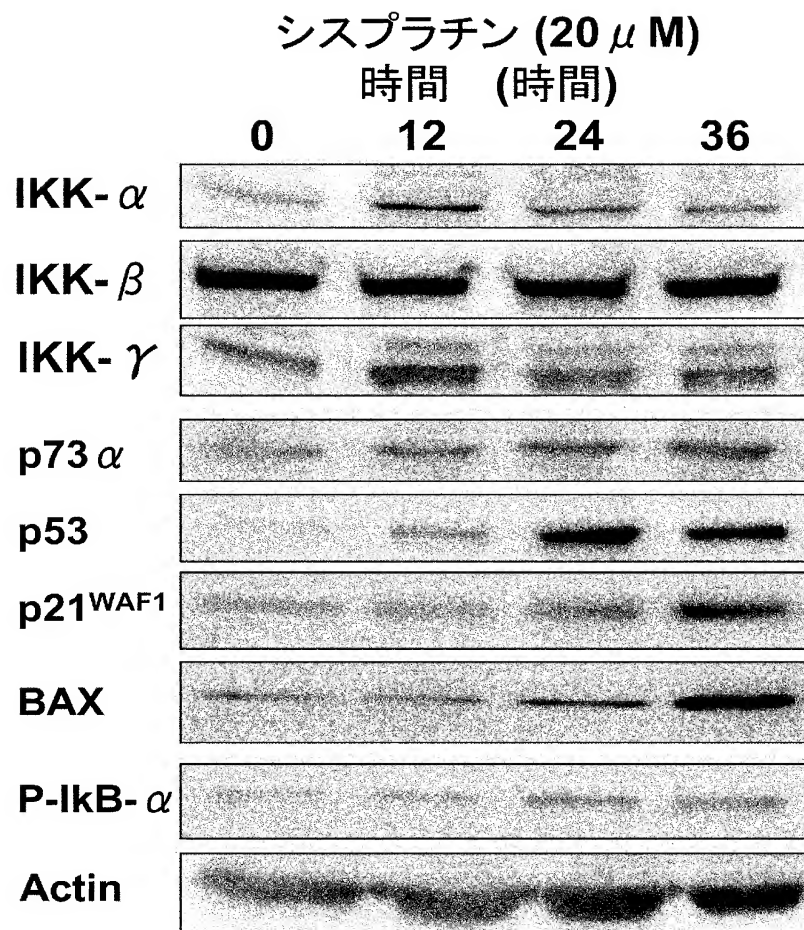
Ser Thr Ile Ile His Glu Ala Asn Glu Glu Gln Gly Asn Ser Met Met  
725 730 735

Asn Leu Asp Trp Ser Trp Leu Thr Glu  
740 745

【書類名】 図面

【図 1】

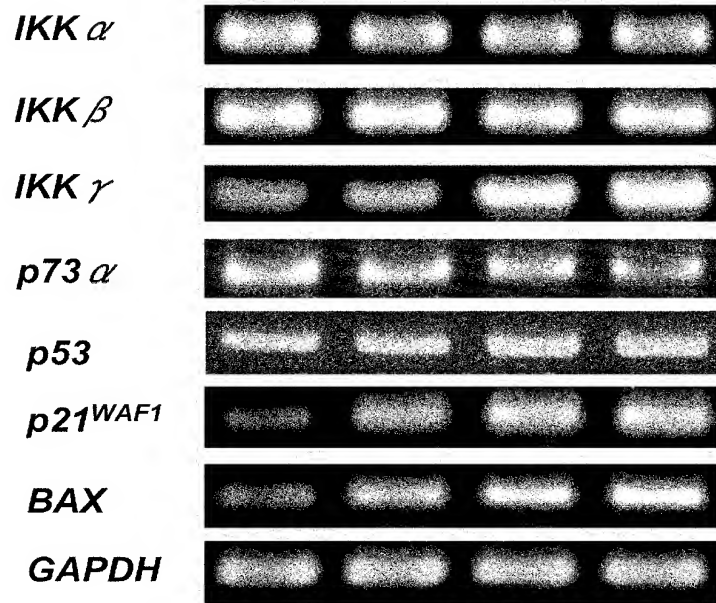


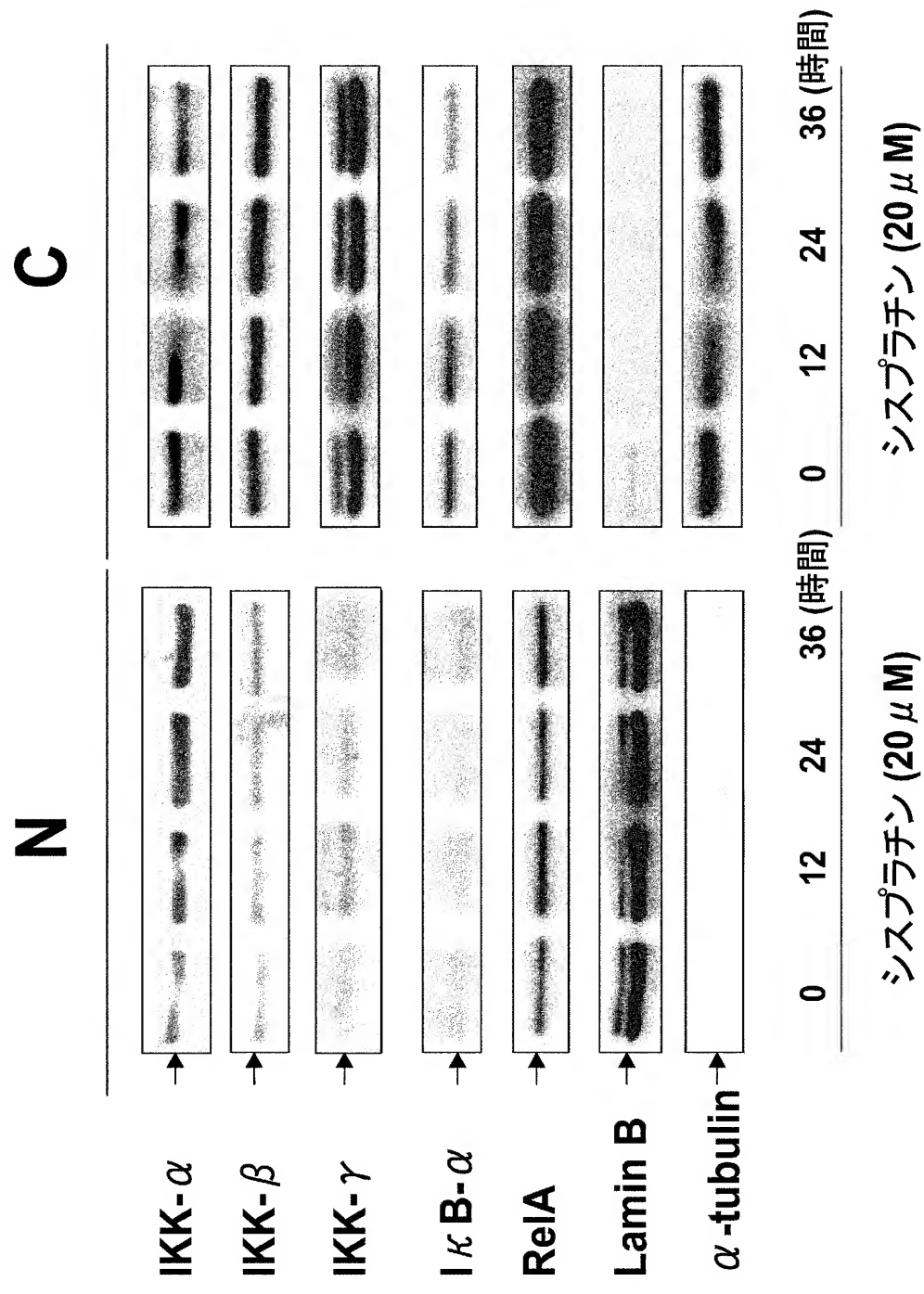


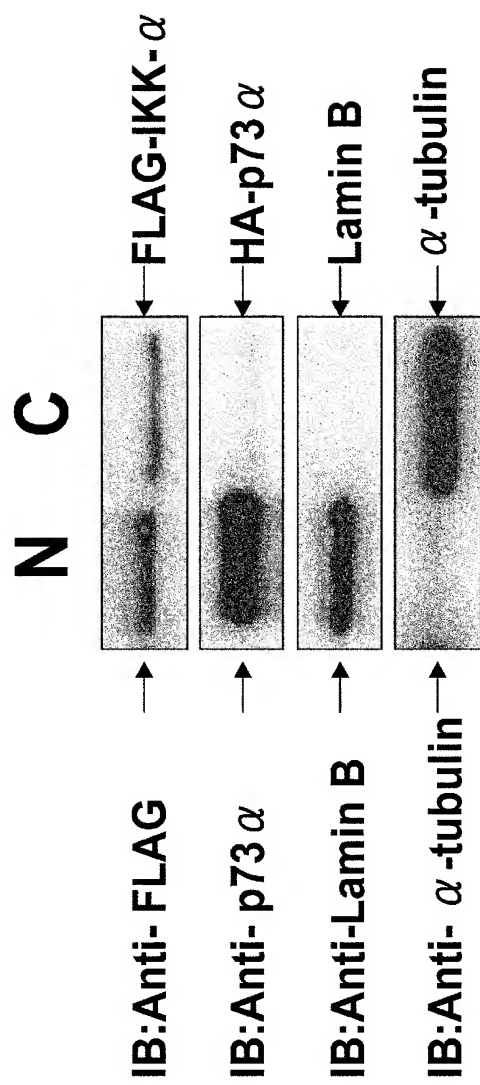
シスプラチン (20  $\mu$  M)

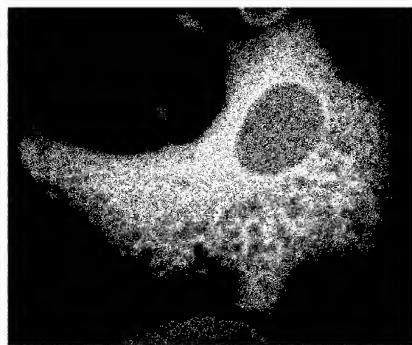
時間(時間)

0      12      24      36

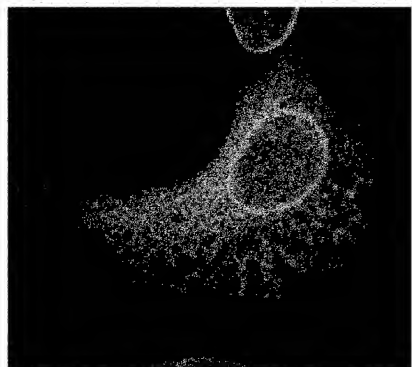




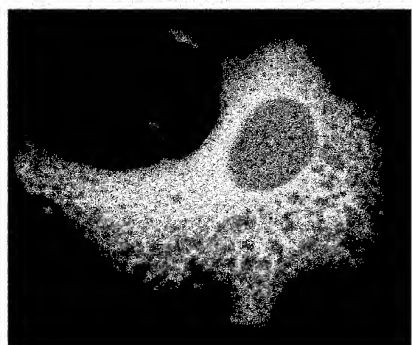




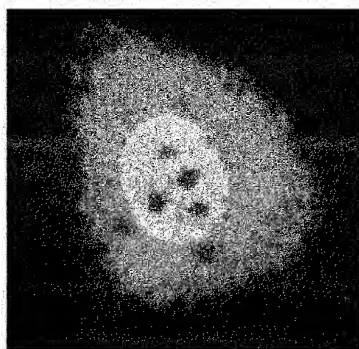
マージ



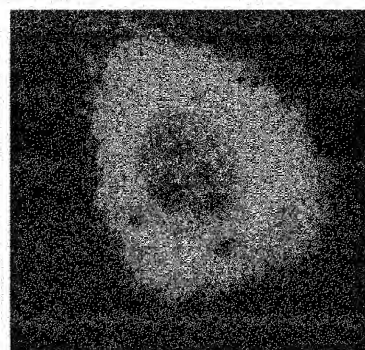
Lamin B



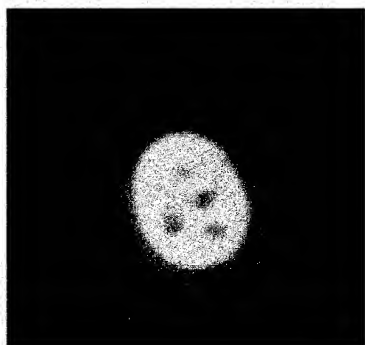
FLAG-IKK- $\alpha$



マージ

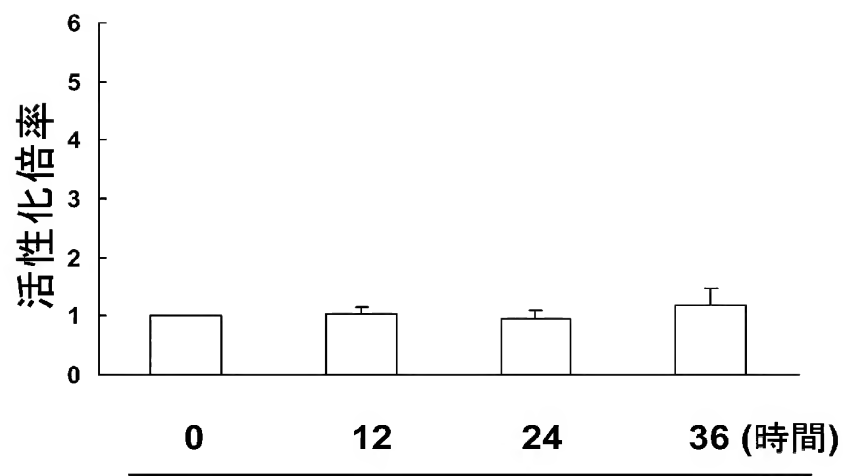


FLAG-IKK- $\alpha$



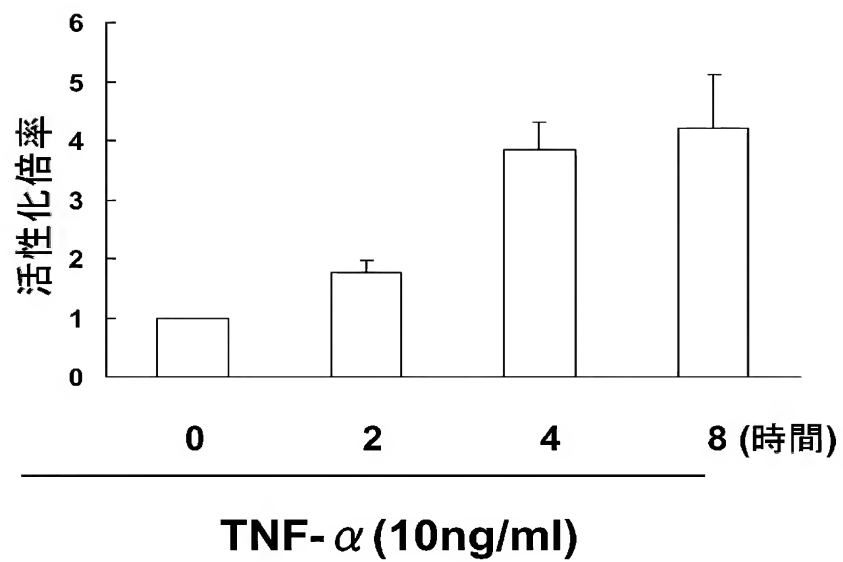
HA-p73 $\alpha$

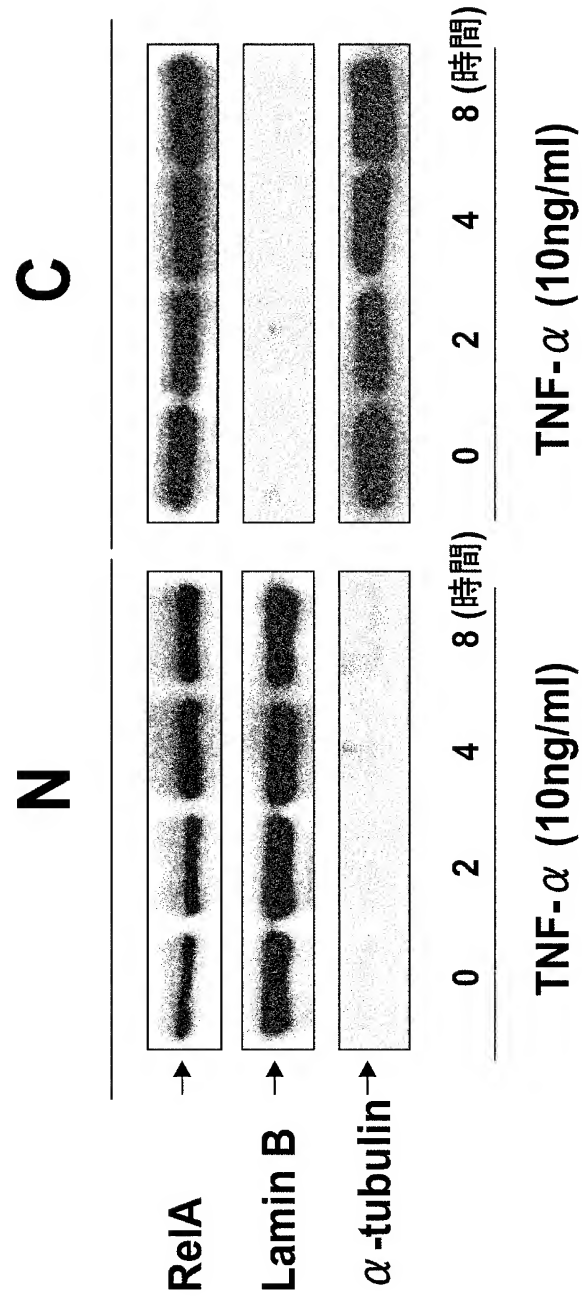
## U2OS

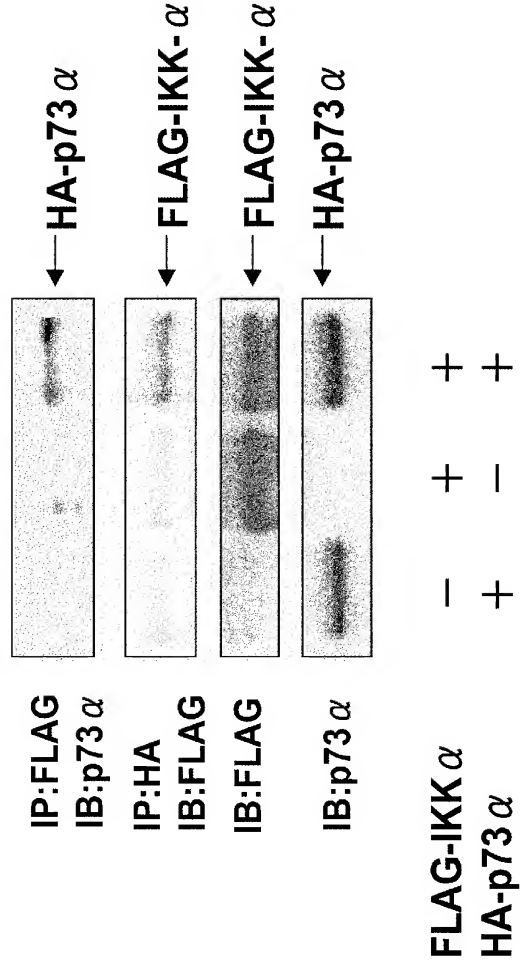


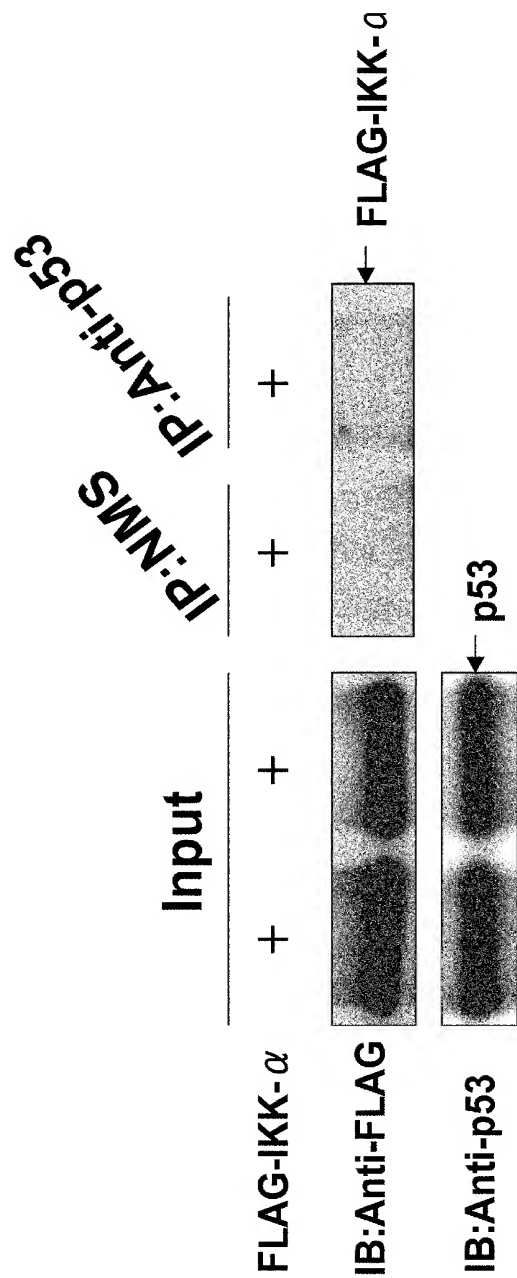
シスプラチン (20  $\mu$  M)

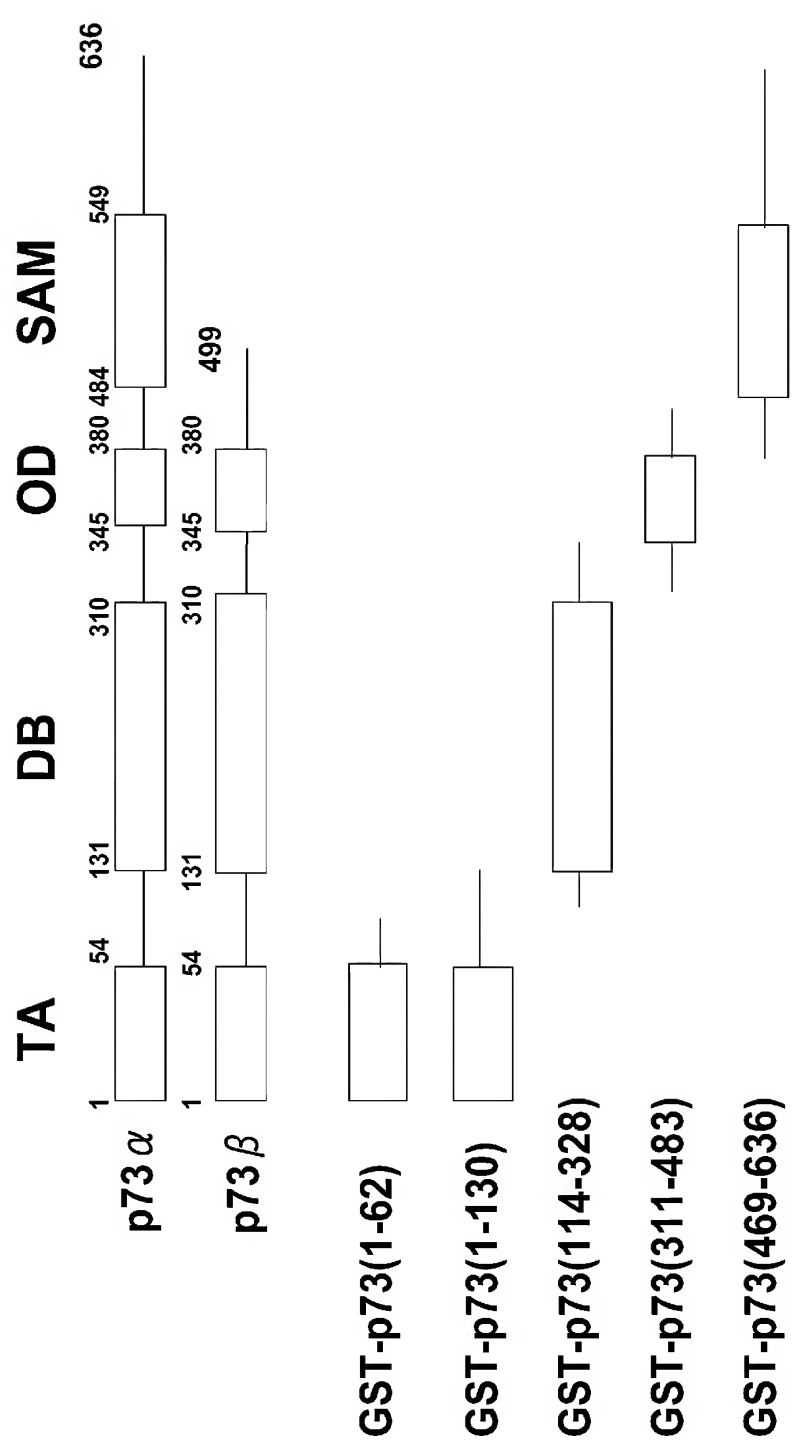
## L929

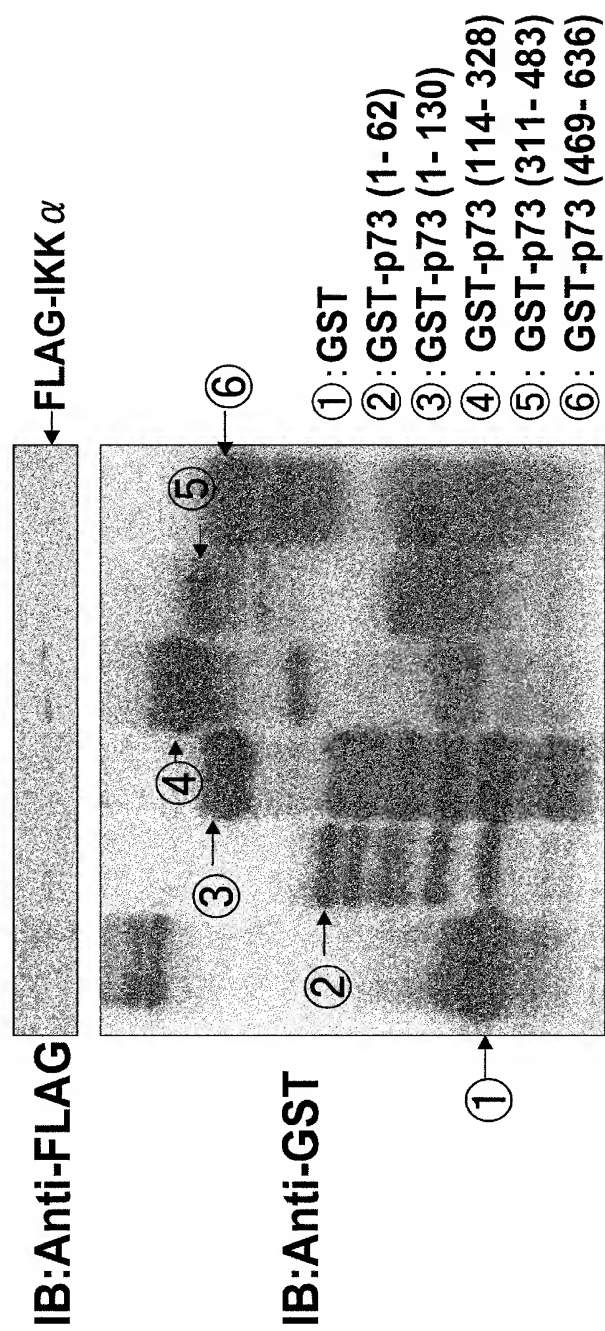


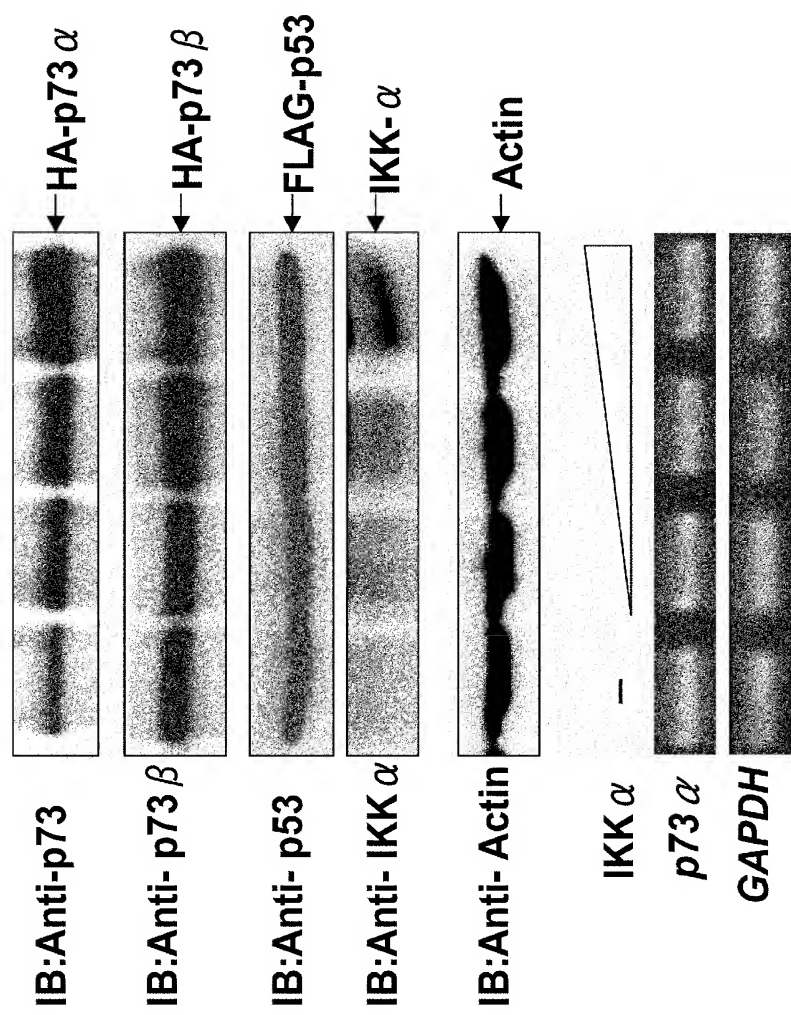


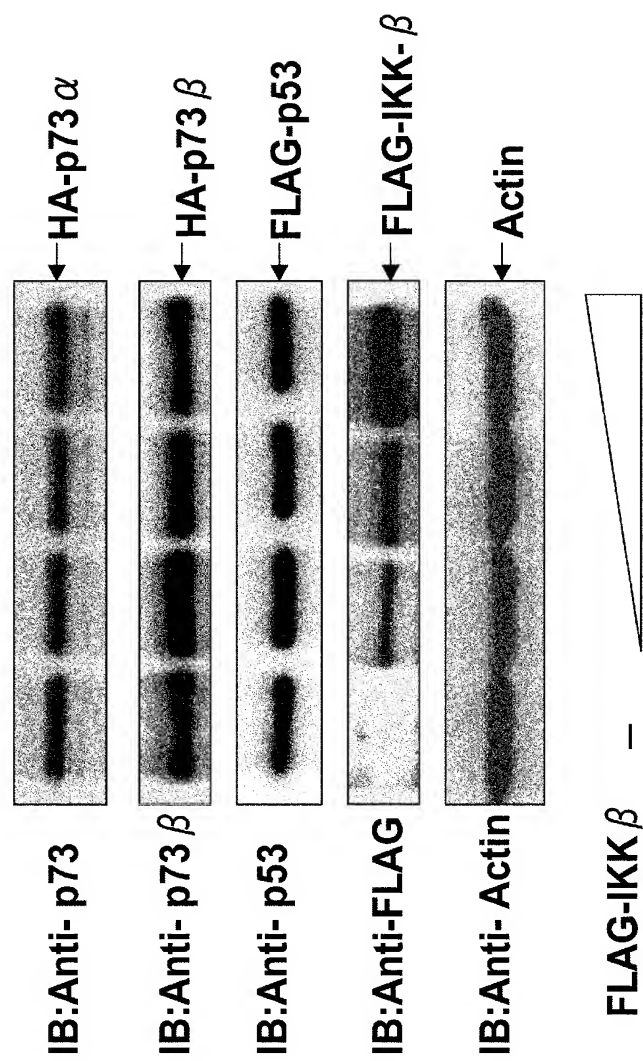


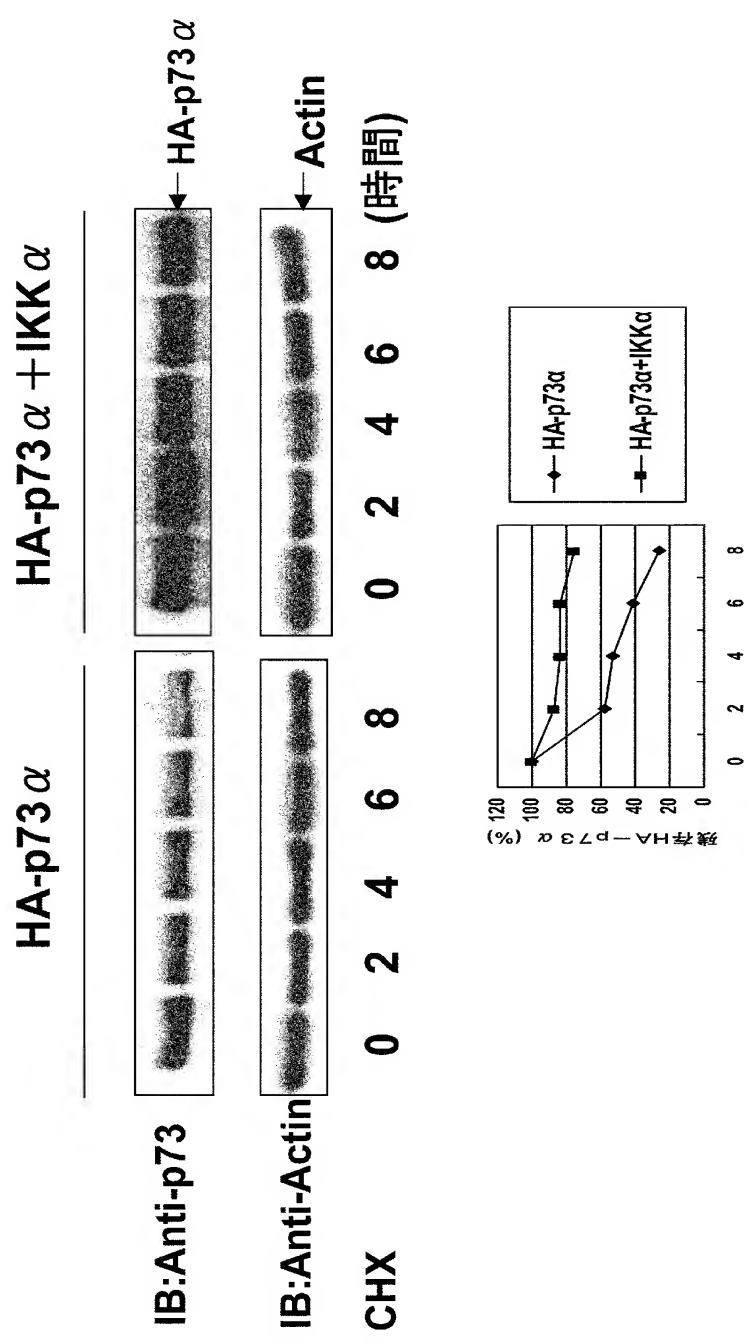




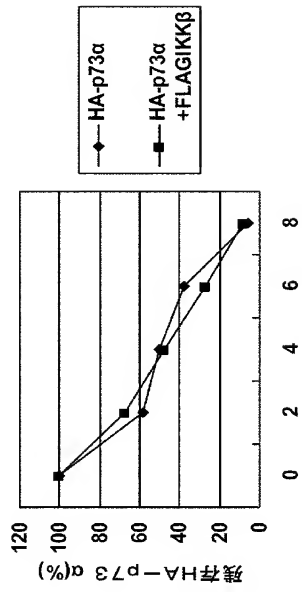
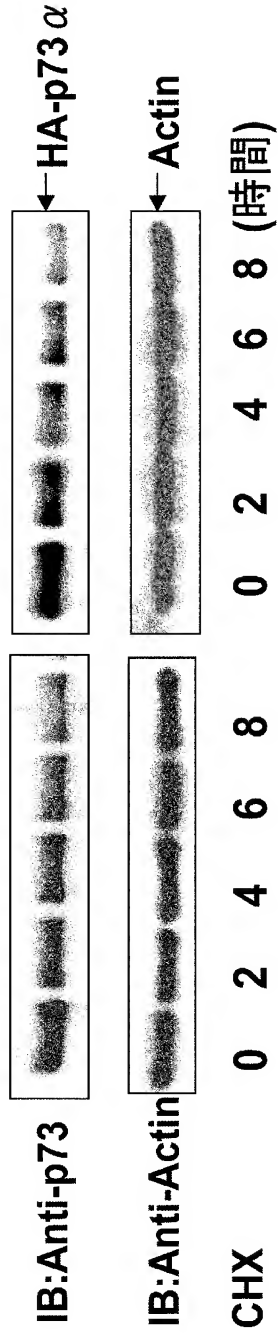


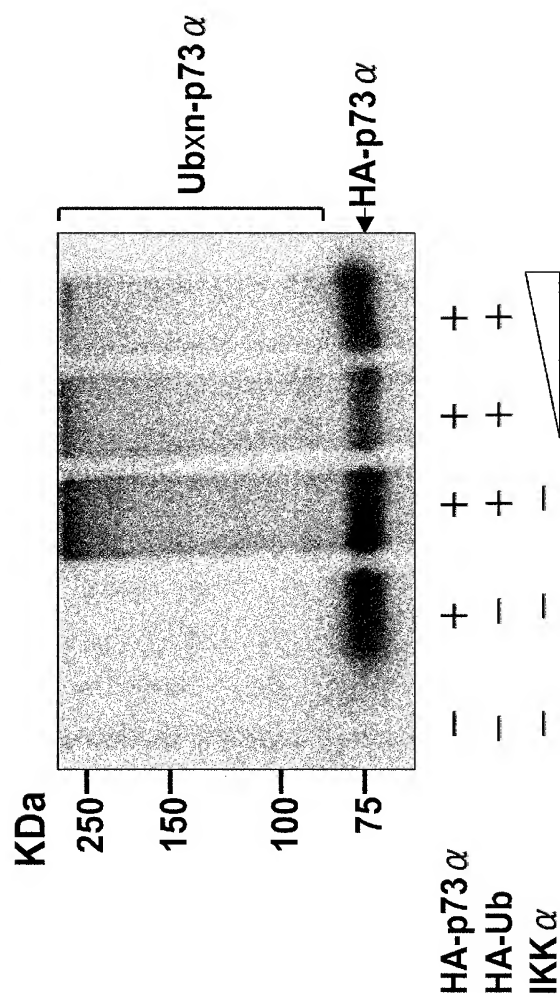


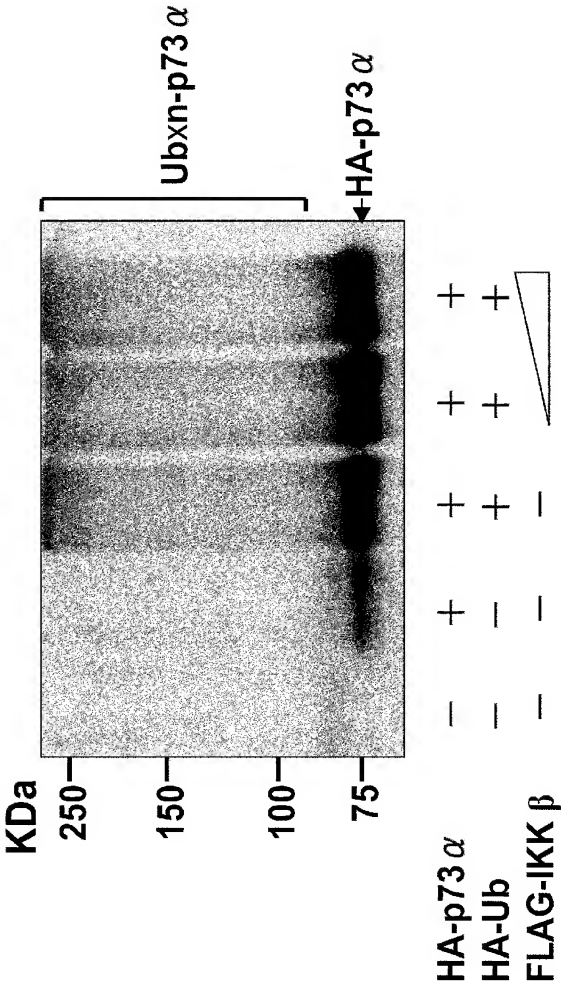


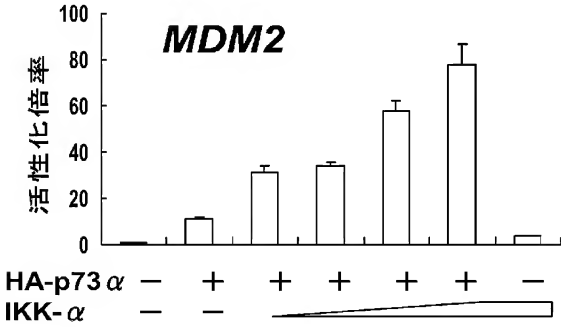
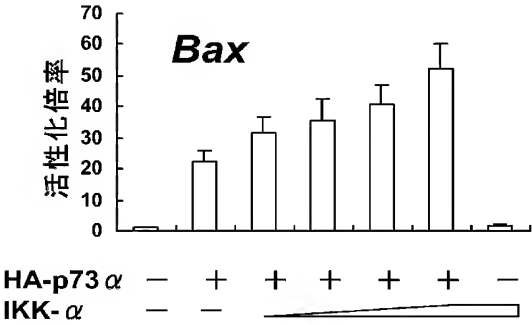
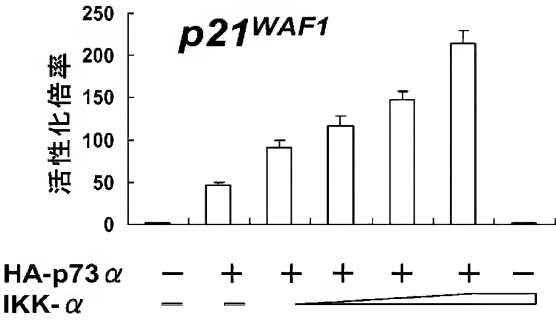


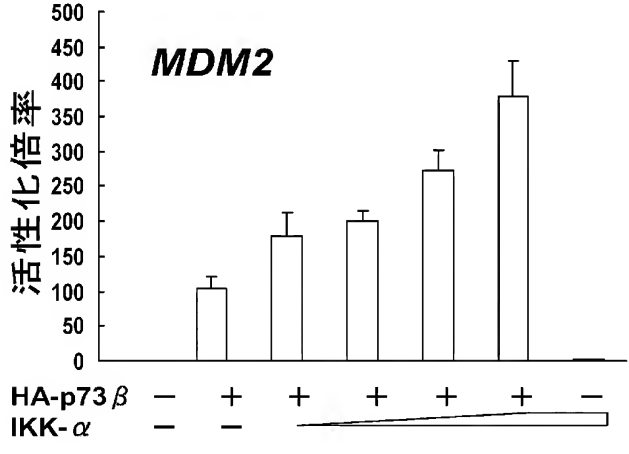
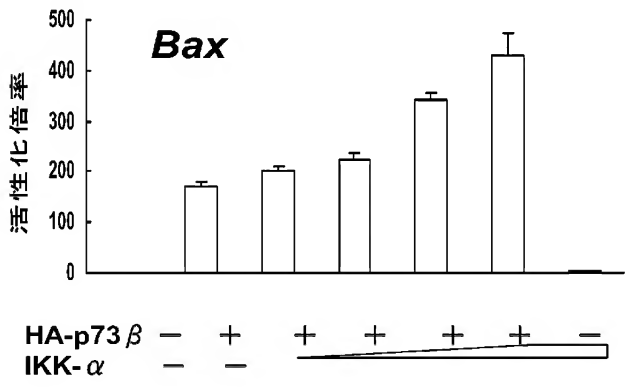
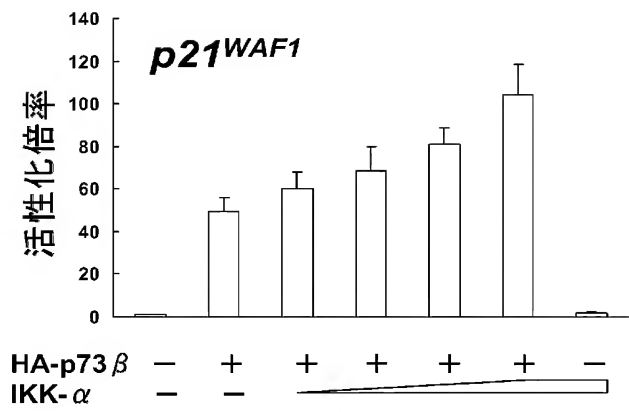
HA-p73 $\alpha$       HA-p73 $\alpha$  + FLAG-IKK $\beta$

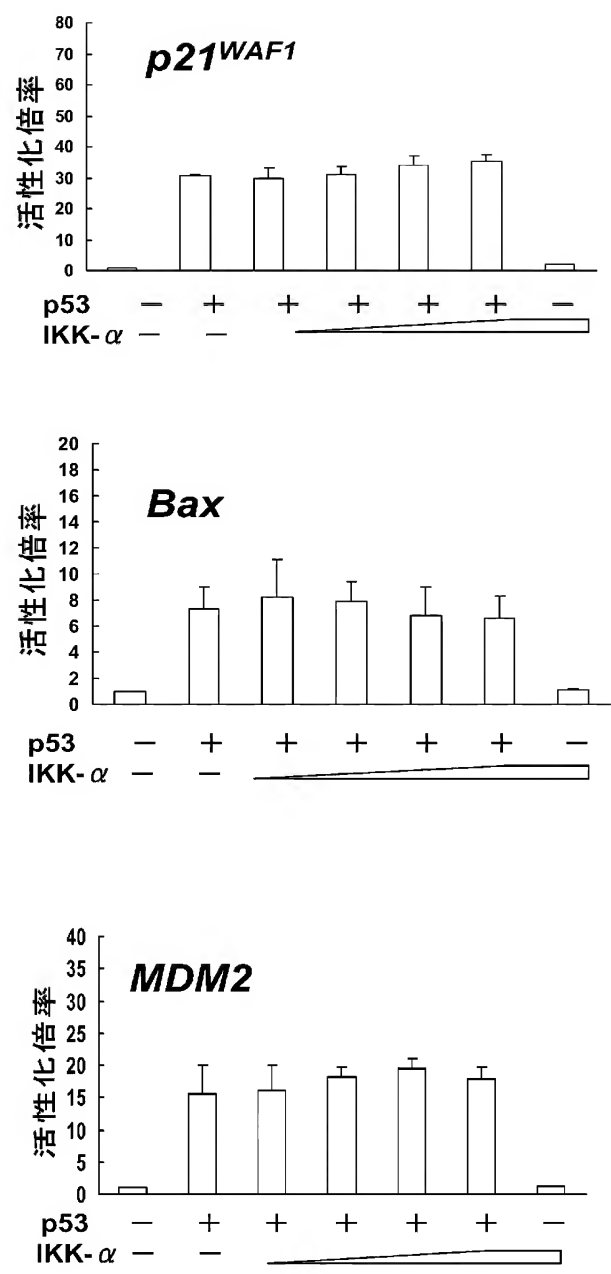


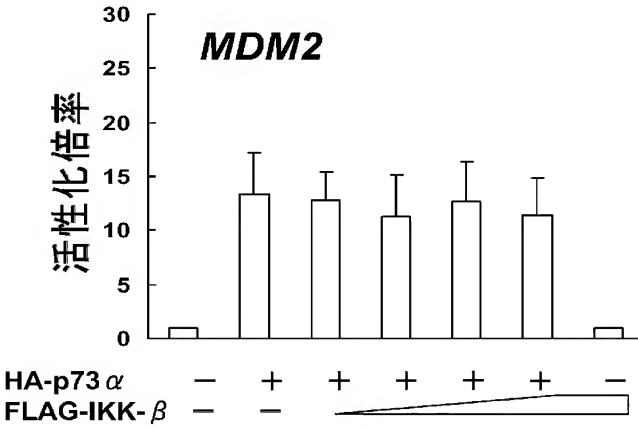
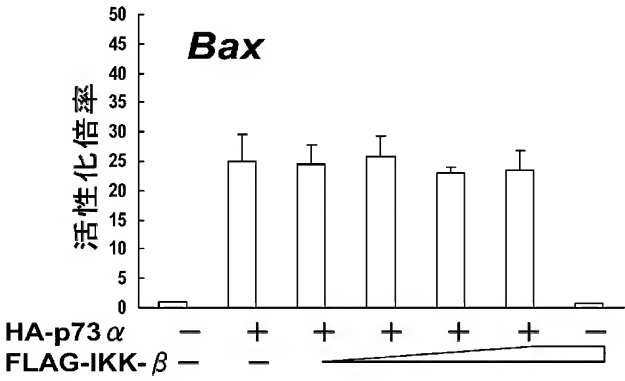
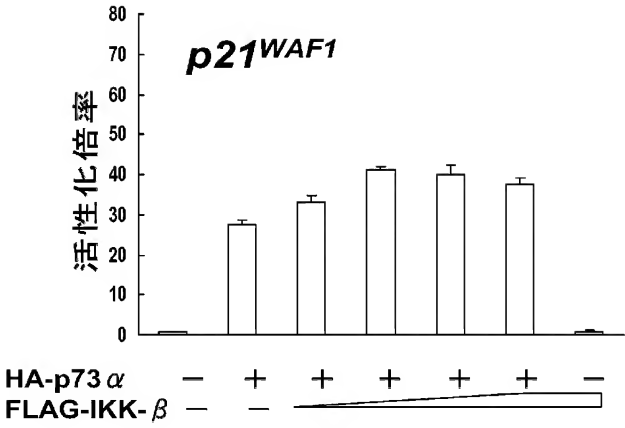


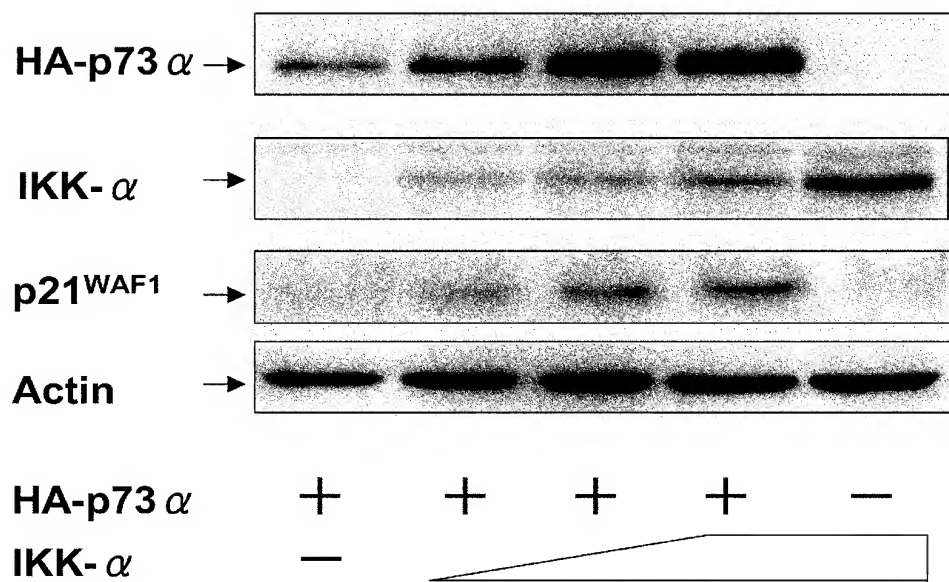


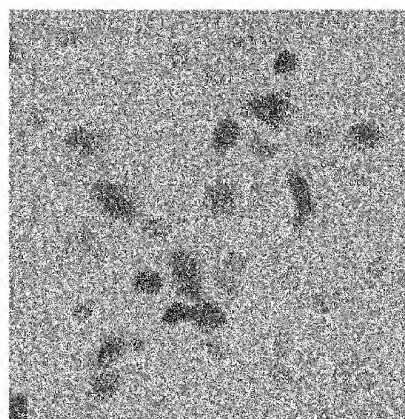




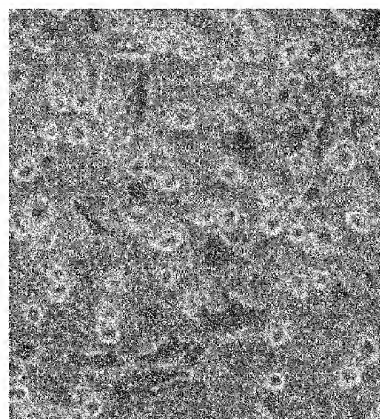




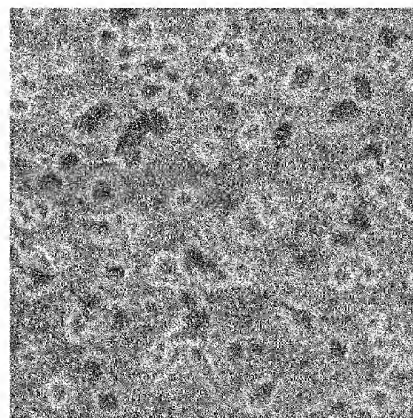




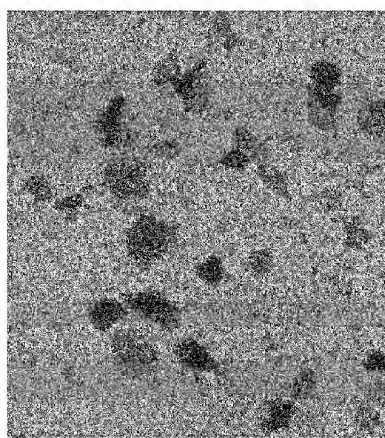
HA-p73  $\alpha$



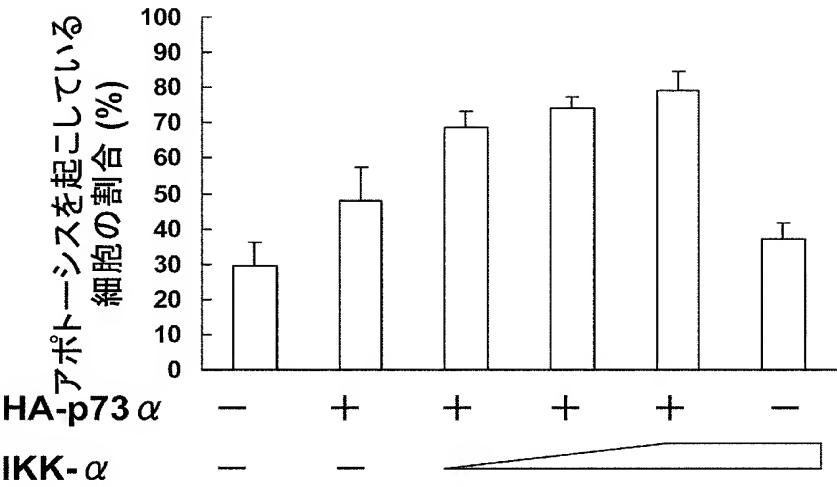
IKK- $\alpha$

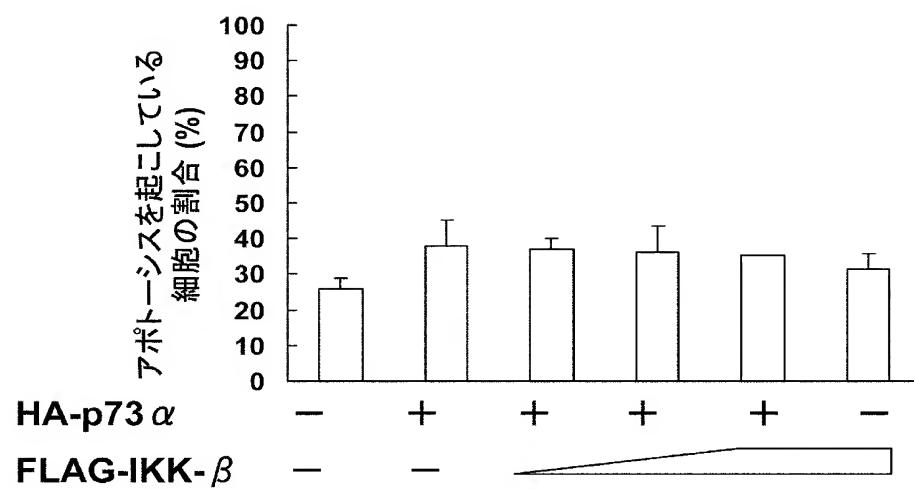


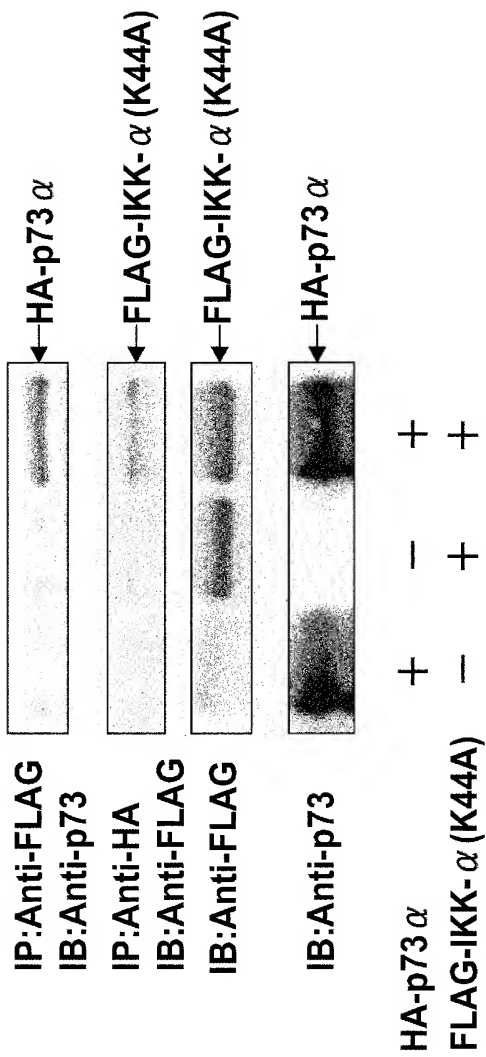
Control



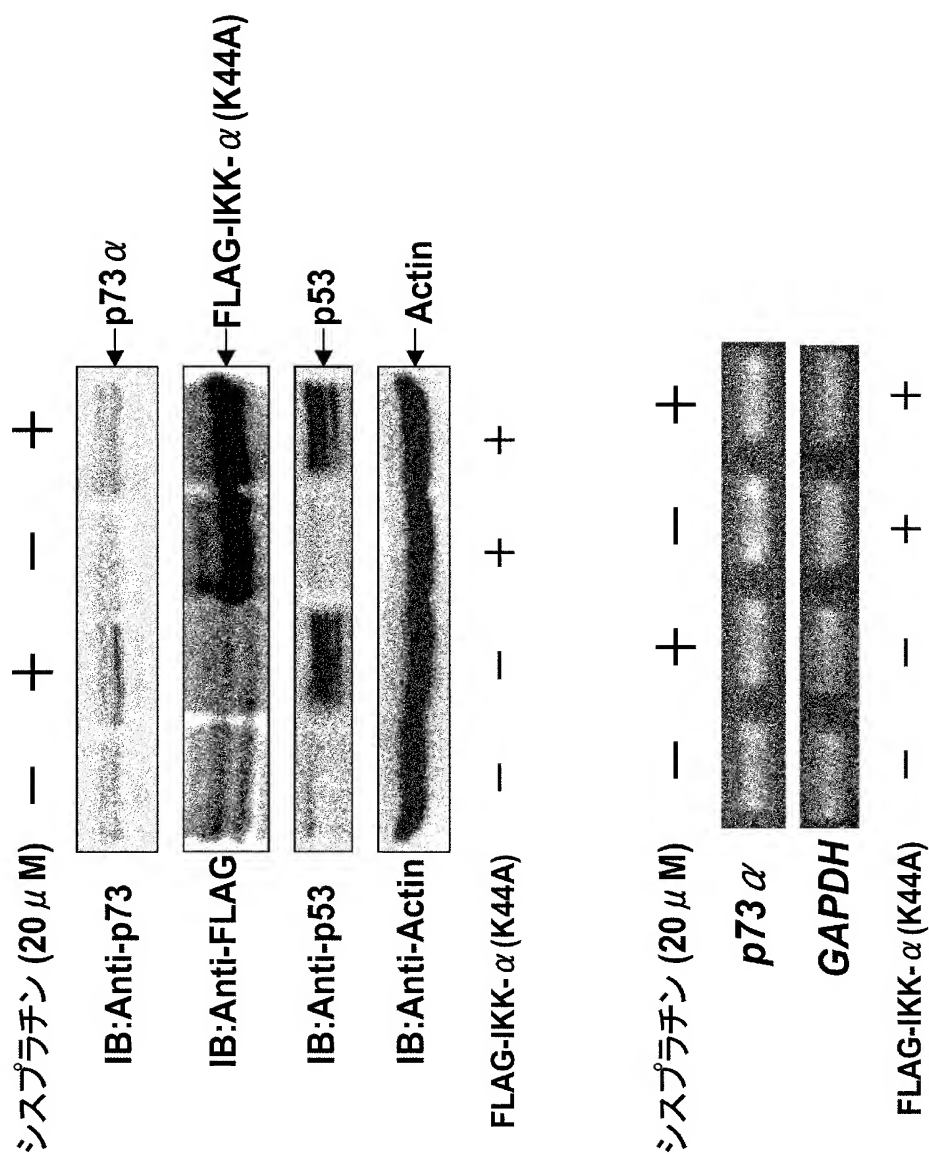
HA-p73  $\alpha$  + IKK- $\alpha$

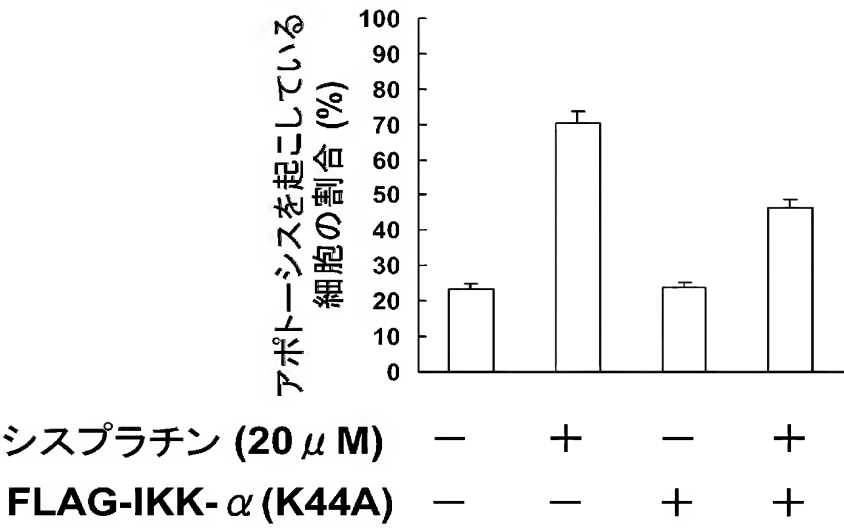


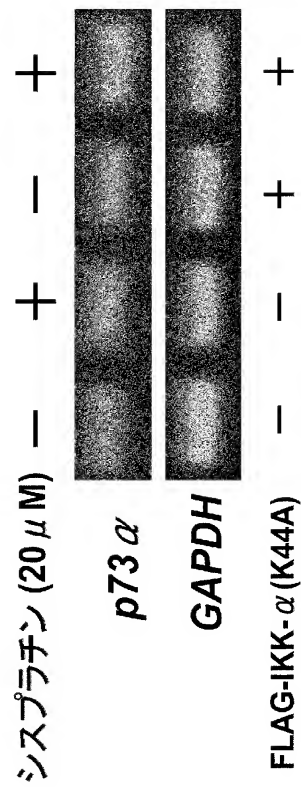
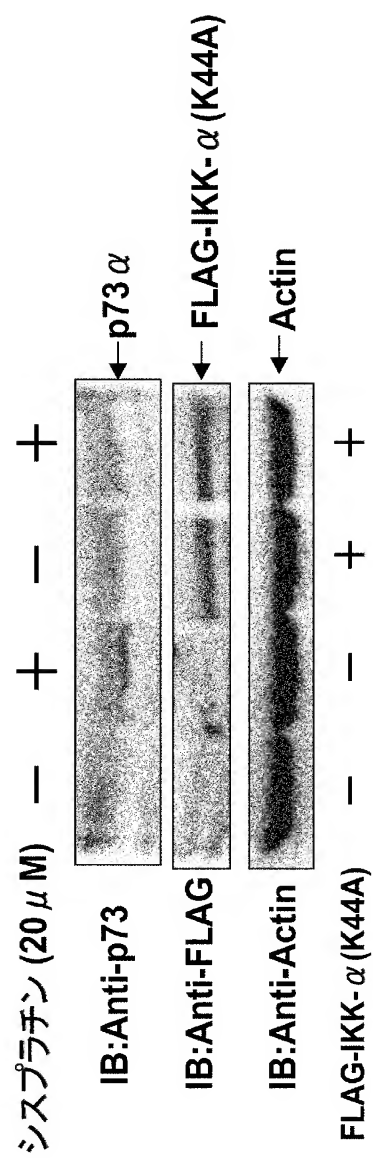


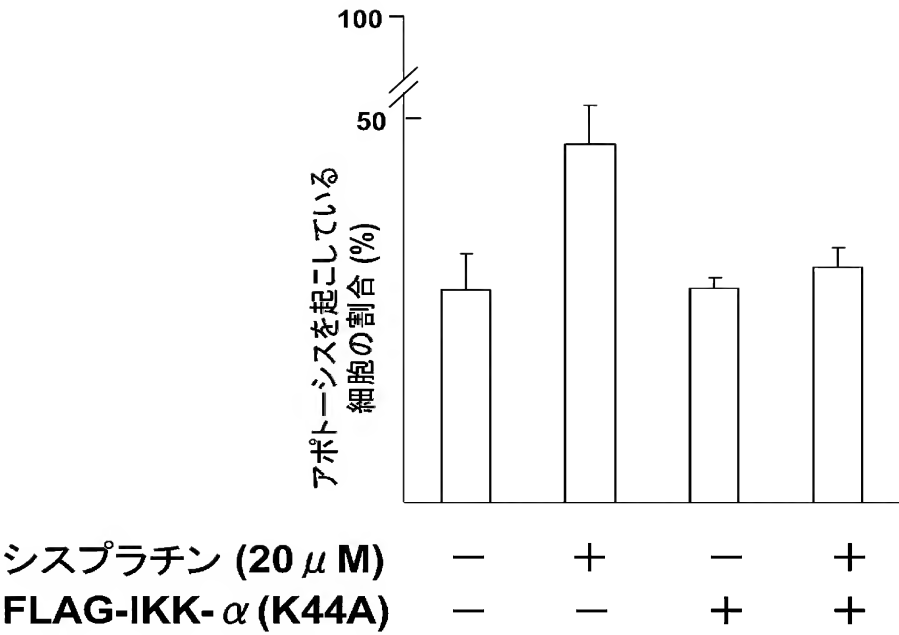


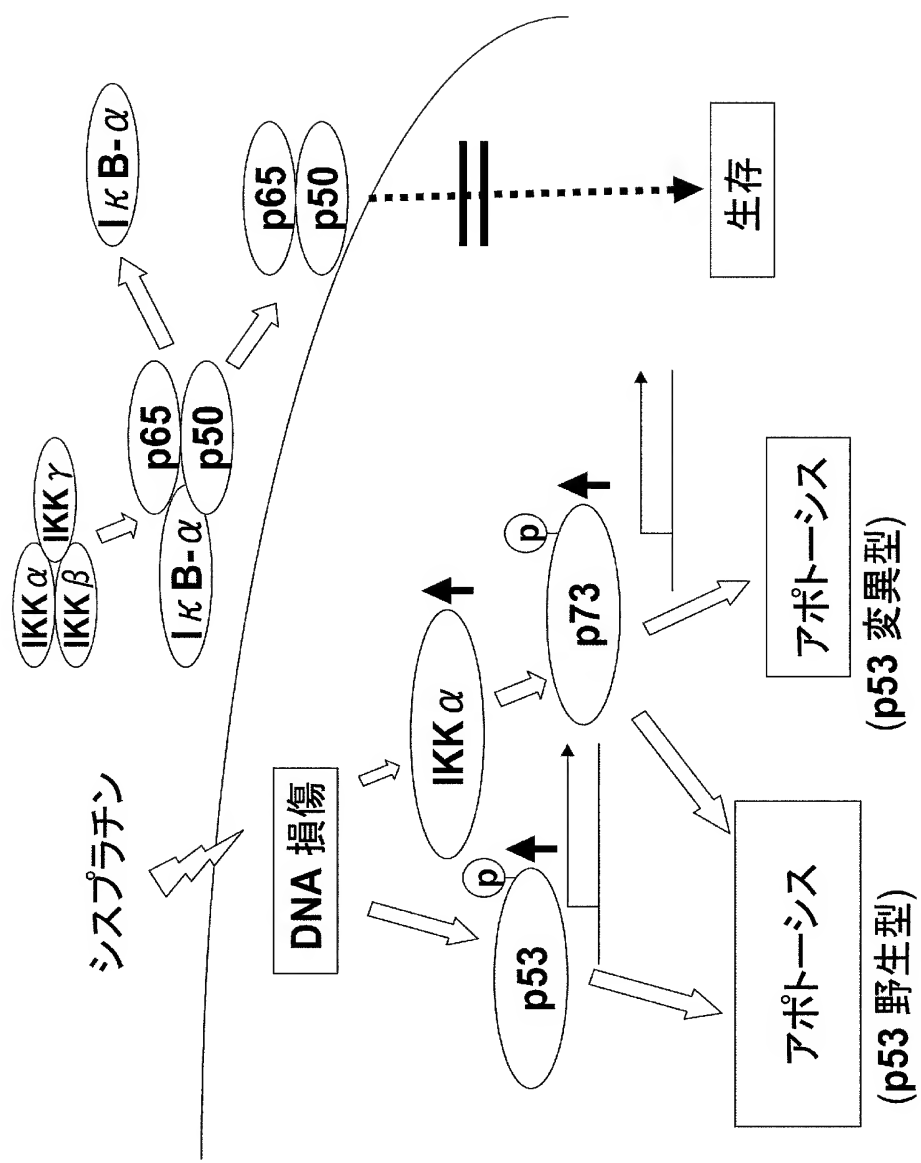












【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 p 7 3 の活性化の分子メカニズムを解明し、そして、そのメカニズムから導き出されたアポトーシスを促進又は抑制する化合物のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 p 7 3 と I K K- $\alpha$  との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法。

【選択図】 図 3 4

## 出願人履歴

0 0 0 1 6 0 5 2 2

19900913

新規登録

佐賀県鳥栖市田代大官町4 0 8番地

久光製薬株式会社